

---

**Der molekulare Adapter BEM-1 in Zellpolarität,  
gerichtetem Wachstum und Zell-Fusion  
in *Neurospora crassa***

VON DER FAKULTÄT FÜR LEBENSWISSENSCHAFTEN  
DER TECHNISCHEN UNIVERSITÄT CAROLO-WILHELMINA

ZU BRAUNSCHWEIG

ZUR ERLANGUNG DES GRADES EINES

DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN

(DR. RER. NAT.)

GENEHMIGTE

DISSERTATION

VON TIMO SCHÜRG  
AUS GIFHORN

---

1. REFERENT:

PROF. DR. ANDRÉ FLEISSNER

2. REFERENT:

PROF. DR. NORBERT F. KÄUFER

EINGEREICHT AM:

27.02.2012

MÜNDLICHE PRÜFUNG (DISPUTATION) AM:

27.03.2012

DRUCKJAHR 2012

### **Vorveröffentlichungen der Dissertation**

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

### **Tagungsbeiträge**

Illgen J., Schürg T., Fleißner, A.: Subcellular localization influences the activity and function of the MAP kinase MAK-2 in cell signaling in *Neurospora crassa*. (Poster). 10<sup>th</sup> VAAM Symposium on Molecular Biology of Fungi, Marburg, GER (2011)

Schürg T., Brandt, U. and Fleißner, A.: Directed growth during germling fusion in *Neurospora crassa* requires BEM-1, a protein which is dispensable for general polar growth. (Poster). 10<sup>th</sup> European Conference on Fungal Genetics, Leeuwenhorst, NL (2010)

Schürg T. and Fleißner, A.: BEM-1 is required for directed but not for general polar growth in *Neurospora crassa*. (Poster). 25<sup>th</sup> Fungal Genetics Conference at Asilomar, CA, USA (2009)

Schürg T. and Fleißner, A.: BEM-1 is required for directed but not for general polar growth in *Neurospora crassa*. (Poster). 9<sup>th</sup> VAAM Symposium on Molecular Biology of Fungi, Münster, GER (2009)

Schürg T. and Fleißner, A.: The role of BEM-1 during germling fusion in *Neurospora crassa*. (Poster). 9<sup>th</sup> European Conference on Fungal Genetics, Edinburgh, GB (2008)

# Inhalt

	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>1</b>
	<b>Abstract .....</b>	<b>4</b>
	<b>Einleitung .....</b>	<b>6</b>
<b>1.1</b>	<b>Zell-Fusion und ihre Bedeutung für höher entwickeltes vielzelliges Leben.....</b>	<b>6</b>
<b>1.2</b>	<b>Zell-Fusion im Modellorganismus <i>N. crassa</i> .....</b>	<b>6</b>
1.2.1	Die Keimlingsfusion erfordert gegenläufig oszillierende Rekrutierung der Proteine MAK-2 und SO zu den Zellspitzen .....	11
<b>1.3</b>	<b>Zellpolarität in filamentösen Pilzen - ein Überblick.....</b>	<b>15</b>
1.3.1	Ausbildung und Aufrechterhaltung von Zellpolarität .....	16
1.3.2	Defekte in Ausbildung und Aufrechterhaltung von Zellpolarität .....	18
1.3.3	Die Bildung vegetativer Sporen in <i>N. crassa</i> .....	18
<b>1.4</b>	<b>Signaltransduktion der Paarungs- Pheromon-Antwort in <i>S. cerevisiae</i> .....</b>	<b>19</b>
<b>1.5</b>	<b>Der molekulare Adapter BEM-1 - von Zellpolarität über MAPK- Signaltransduktion zu reaktiven Sauerstoffspezies .....</b>	<b>23</b>
1.5.1	Bem1p und seine Funktion in Knospung, Symmetrie-Brechen und Paarung in <i>S. cerevisiae</i> .....	25
1.5.1.1	<i>Bem1p während Knospung und Symmetrie-Brechen .....</i>	<i>25</i>
1.5.1.2	<i>Bem1p und seine Rolle in der Signaltransduktion der Pheromon-Antwort .....</i>	<i>29</i>
1.5.2	BEM-1 - ein Regulator von NADPH-Oxidase? .....	30
<b>1.6</b>	<b>Zielsetzung .....</b>	<b>32</b>
	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>34</b>
<b>2.1</b>	<b>Chemikalien, Puffer und Lösungen</b>	
	Tab. 2.1: Chemikalien .....	34
	Tab. 2.2: Puffer und Lösungen .....	35



<b>2.2</b>	<b><i>N. crassa</i> Stämme und Anzuchtbedingungen .....</b>	<b>38</b>
	Tab. 2.3: Kulturmedien .....	39
	Tab. 2.4: <i>N. crassa</i> -Sämme .....	40
	Tab. 2.5: Plasmide .....	41
	Tab. 2.6: Primer .....	42
2.2.1	Konstruktion der <i>N. crassa</i> $\Delta$ <i>bem-1</i> Mutanten .....	43
2.2.2	Konstruktion von Stämmen auf Basis des Vektors pMF272 .....	44
<b>2.3</b>	<b>Elektroporation von <i>N. crassa</i> .....</b>	<b>44</b>
<b>2.4</b>	<b>Kreuzung und Aktivierung von Ascosporen.....</b>	<b>45</b>
<b>2.5</b>	<b>Quantifizierung von Wachstumsraten und Sporenmengen .....</b>	<b>45</b>
2.5.1	Quantifizierung des linearen Hyphenwachstums .....	45
2.5.2	Quantifizierung des Lufthyphenwachstums.....	45
2.5.3	Quantifizierung der Makrokonidien pro Kulturröhrchen .....	46
2.5.4	Quantifizierung der Mikrokonidien pro Kulturplatte.....	46
<b>2.6</b>	<b>Mikroskopische Analysen .....</b>	<b>46</b>
2.6.1	Probenvorbereitung für die Mikroskopie.....	46
2.6.2	Konventionelle Licht- und Fluoreszenzmikroskopie.....	47
2.6.3	Deconvolutions-Mikroskopie im fluoreszierenden Weitfeld .....	47
2.6.4	Laser Scanning Mikroskopie und FRAP .....	48
<b>2.7</b>	<b>Quantifizierung der gerichteten Keimlingsinteraktionen .....</b>	<b>49</b>
<b>2.8</b>	<b>Assay zur Evaluierung des gerichteten Wachstums der Trichogynen .....</b>	<b>49</b>
<b>2.9</b>	<b>Quantifizierung der Keimlingsfusion / Fusionsporenbildung.....</b>	<b>50</b>
<b>2.10</b>	<b>Molekularbiologische Methoden .....</b>	<b>50</b>
2.10.1	Isolierung von DNA aus <i>N. crassa</i> .....	50
2.10.2	Isolierung von RNA aus <i>N. crassa</i> .....	51
2.10.3	Amplifizierung von DNA mittels PCR .....	51
2.10.4	Klonierungen.....	51
2.10.5	<i>E. coli</i> Plasmid-Präparation.....	51
2.10.6	Yeast recombinational cloning (YRC).....	51

2.10.7	Southern-Analyse .....	52
2.10.8	Western-Analyse.....	52
2.10.9	Bearbeitung von DNA- und Proteinsequenzen.....	53
<b>Ergebnisse .....</b>		<b>54</b>
<b>3.1</b>	<b>Identifizierung eines <i>bem-1</i> Homologs in <i>N. crassa</i> .....</b>	<b>54</b>
<b>3.2</b>	<b>Konstruktion einer <math>\Delta bem-1</math> Deletionsmutante .....</b>	<b>55</b>
3.2.1	Deletion von <i>bem-1</i> in Wildtyp-Stamm N1-05 .....	56
3.2.2	Deletion von <i>bem-1</i> in Wildtyp-Stamm N1-06 .....	59
3.2.3	Komplementation der <i>bem-1</i> Deletion in Stamm 21-A1 .....	60
<b>3.3</b>	<b>Phänotypische Charakterisierung der <math>\Delta bem-1</math> Mutante .....</b>	<b>62</b>
3.3.1	Die $\Delta bem-1$ Mutante zeigt Defekte in Lufthyphen- und Sporenbildung sowie einen generellen Wachstumsdefekt .....	62
3.3.2	Die vegetativen Hyphen der $\Delta bem-1$ Mutante zeigen hinsichtlich ihrer Morphologie keine Unterschiede zum Wildtyp .....	65
3.3.3	Die $\Delta bem-1$ Konidiosporen zeigen eine mit dem Wildtyp vergleichbare Keimungskinetik .....	66
3.3.4	Die $\Delta bem-1$ Mutante produziert deutlich größere Makrokonidien im Vergleich zum Wildtyp .....	66
3.3.5	Die Anzahl der $\Delta bem-1$ Keimlinge mit mehr als einem Keimschlauch ist vergleichbar mit der des Wildtyps .....	68
3.3.6	Die gerichteten Interaktionen der $\Delta bem-1$ Keimlinge sind stark eingeschränkt .....	69
3.3.7	Die $\Delta bem-1$ Mutante zeigt Defekte in der Fusion vegetativer Hyphen .....	73
3.3.8	Das gerichtete Wachstum der $\Delta bem-1$ Trichogynen während der sexuellen Phase ist nicht beeinträchtigt.....	74
3.3.9	BEM-1 ist essentiell für die Produktion von keimungsfähigen Ascosporen .....	76

<b>3.4</b>	<b>Untersuchung der subzellulären Lokalisation und Dynamik von BEM-1-GFP in <i>N. crassa</i></b>	<b>77</b>
3.4.1	BEM-1-GFP lokalisiert an der Spitze von wachsenden Hyphen und an der Septenpore	78
3.4.2	Unabhängig von der gerichteten Interaktion der Keimlinge lokalisiert BEM-1-GFP an der Spitze der Keimschläuche	79
3.4.3	Untersuchung der subzellulären Lokalisation von BEM-1-GFP unter nativen Expressionsbedingungen	80
3.4.4	BEM-1-GFP wird während der Keimlingsfusion in einer hoch dynamischen Weise an den Fusionspunkt rekrutiert	83
3.4.5	Die Zell-Zell-Fusion während der Keimlingsinteraktionen ist in der $\Delta bem-1$ Mutante nicht beeinträchtigt	84
3.4.6	Die Rekrutierung von BEM-1-GFP an die Hyphenspitze und die Septenpore erfolgt ebenso mit einer hohen Austausch-Dynamik	85
<b>3.5</b>	<b>Ein N-terminal künstlich verlängertes BEM-1 hat einen dominant negativen Effekt auf die Zellpolarität</b>	<b>89</b>
<b>3.6</b>	<b>Untersuchung des Einflusses von BEM-1 auf die subzelluläre Dynamik von MAK-2 und SO</b>	<b>96</b>
3.6.1	BEM-1 und MAK-2 kolokalisieren während der Keimlingsfusion nach Herstellung des Zell-Zell-Kontakts an der Fusionspore	96
3.6.2	BEM-1 ist entbehrlich für die Rekrutierung von MAK-2-GFP zum Fusionspunkt während der Keimlingsfusion	98
3.6.3	BEM-1 ist entbehrlich für die Rekrutierung von SO-GFP an die Plasmamembran in gerichtet interagierenden Keimlingen	100
3.6.4	Die gerichteten Keimlingsinteraktionen und die Keimlingsfusion der $\Delta bem-1$ Mutante sind instabil	101
3.6.5	Das Fehlen von BEM-1 führt zu einer verzögerten Aktivierung von MAK-2	104

<b>3.7</b>	<b>Analyse der Funktionen der einzelnen BEM-1 Proteindomänen...</b>	<b>107</b>
3.7.1	Konstruktion der BEM-1 Domänen Knock-out Stämme .....	107
3.7.2	Die beiden SH3-Domänen übernehmen partiell redundante Funktionen .....	108
3.7.3	Die PX-Domäne hat weder Einfluss auf die Funktionen von BEM-1 noch auf seine subzelluläre Lokalisierung .....	110
3.7.4	Die PB1-Domäne hat einen Einfluss auf die gerichteten Keimlingsinteraktionen und die Definition der Sporengröße .....	111
3.7.5	Die BEM-1-Domänen PB1, SH3a und SH3b fördern die gerichteten Interaktionen der Keimschlauchspitzen .....	111
<b>3.8</b>	<b>Untersuchung des Einflusses von BEM-1 auf die Polarisom- komponente SPA-2 und das Spitzenkörperprotein CHS-1 .....</b>	<b>114</b>
<b>3.9</b>	<b>Untersuchung der subzellulären Lokalisation der MAPKK STE-7 während der Keimlingsfusion .....</b>	<b>116</b>

## **Diskussion**

<b>4.1</b>	<b>BEM-1 ist entbehrlich für die Ausbildung und Aufrechterhaltung genereller Hyphenpolarität in <i>N. crassa</i> .....</b>	<b>118</b>
<b>4.2</b>	<b>BEM-1 ist notwendig für die Regulierung der Zellpolarität während der Makrokonidienbildung.....</b>	<b>122</b>
<b>4.3</b>	<b>BEM-1 ermöglicht effizientes Interagieren zwischen poten- tiellen Fusionspartnern während der vegetativen Zell-Fusion .....</b>	<b>126</b>
<b>4.4</b>	<b>Verbindet BEM-1 ROS-basierte Signalmechanismen mit der Zellpolaritätsmaschinerie? .....</b>	<b>129</b>
<b>4.5</b>	<b>BEM-1 - ein zentraler Modulator von Zellpolarität, MAPK- Signaltransduktion und ROS-Signaling? - ein Arbeitsmodell .....</b>	<b>133</b>

<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>137</b>
-----------------------------------	------------

<b>Anhang .....</b>	<b>148</b>
---------------------	------------

<b>Abkürzungen .....</b>	<b>154</b>
--------------------------	------------

## **Danksagung**

## **Lebenslauf**

## Zusammenfassung

Zell-Fusion ist ein Prozess, welcher für Fortpflanzung und Entwicklung vielzelliger Eukaryoten essentiell ist. Er bildet unter anderem die Grundlage für die Vereinigung von Spermium und Eizelle, die Bildung von Knochen und Muskeln sowie von Organen wie der Plazenta. Trotz der diversen Prozesse, in denen Zell-Fusion involviert ist, finden sich in jedem die folgenden Grundprinzipien wieder: Wahrnehmung der Partnerzelle, Herstellung des Zell-Zell-Kontakts, Auflösen und Vereinigen von extrazellulärer Matrix bzw. Zellwand sowie in letzter Konsequenz das Verschmelzen der Plasmamembranen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde der filamentöse Pilz *Neurospora crassa* als Modellorganismus zur Untersuchung eukaryotischer Zell-Fusion verwendet. Keimende vegetative Sporen von *N. crassa* wachsen gerichtet aufeinander zu und fusionieren. Zur gegenseitigen Wahrnehmung kommunizieren sie hierbei vermutlich über sekretierte Signalmoleküle. Um den für die Fusion nötigen Zell-Zell-Kontakt zu erreichen, nähern sich die Zellen durch fein abgestimmtes Ausrichten des zellulären Wachstums der Keimschläuche einander an. Frühere Studien zeigten, dass die Proteine MAK-2 und SO während der Phase des polarisierten, gerichteten Wachstums entgegengesetzt oszillierend aus dem Zytosol an die Plasmamembran der Keimschlauchspitzen rekrutiert werden. Diese Beobachtung deutet auf einen Kommunikations-Mechanismus hin, welcher vermutlich auf wechselseitigem Senden und Empfangen beruht. Das Homolog der MAP Kinase MAK-2 in *Saccharomyces cerevisiae* Fus3p ist Teil einer MAP Kinase-Signalkaskade, welche nach Bindung des Paarungs-Pheromons an seinen Rezeptor aktiviert wird. Das Signalprotein Bem1p sorgt bei diesem Prozess mit seinen Protein-Protein-Interaktionsdomänen für eine molekulare Verbindung zwischen dem MAP Kinase - Modul, den stromaufwärts befindlichen Komponenten der Signalkaskade und der Zellpolaritätsmaschinerie. Darüber hinaus wurde für homologe Proteine in filamentösen Pilzen eine Beteiligung an der Aktivierung von ROS-generierenden NADPH-Oxidasen gezeigt. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde das entsprechende *N. crassa* Homolog BEM-1 identifiziert. Eine  $\Delta bem-1$  Mutante zeigte starke Defekte in der vegetativen Keimlings- und Hyphenfusion. Während die Keimschläuche des Wildtyps in einer entsprechenden Untersuchung zu 75% miteinander interagierten, schienen sich die  $\Delta bem-1$  Keimschläuche zu ignorieren und ungerichtet polar aneinander vorbei zu wachsen. Vegetative Zell-Fusion von

*Δbem-1* Keimlingen war ausschließlich über kurze Distanzen mit Hilfe von schmalen Fusionsbrücken, sogenannten CATs, möglich. Darüber hinaus bildete die *Δbem-1* Mutante deutlich weniger Makrokonidien, welche sich im Vergleich zum Wildtyp durch eine überdurchschnittliche Größe auszeichneten. Ein BEM-1-GFP Fusionsprotein wurde an der Spitze von wachsenden Hyphen und Keimlingen sowie an den Septen detektiert. Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass BEM-1 mit Komponenten der Polaritätsmaschinerie interagiert. Ein artifiziell am N-terminus verlängertes BEM-1-GFP-Fusionsprotein, welches den Keimlingsfusionsdefekt komplementierte, führte während der Sporenkeimung zur Ausbildung von multiplen Polaritätsachsen. Diese Beobachtung könnte darauf hindeuten, dass BEM-1 während der verschiedenen Polarisations-Ereignisse in unterschiedlichen molekularen Komplexen agiert. Während der gerichteten Interaktion fusionierender Keimlinge konzentrierte sich BEM-1-GFP am Fusionspunkt und an der sich öffnenden Fusionspore in Form eines transienten Rings. FRAP-Analysen zeigten, dass BEM-1 auch nach Herstellung des Zell-Zell-Kontakts aus dem Zytoplasma rekrutiert wird. Diese Beobachtung deutet auf eine Funktion hin, welche unabhängig vom gerichteten Wachstum ist. Die Untersuchung der Zell-Fusions-Effizienz von *Δbem-1* Keimlingen, welche mit Hilfe von CATs Zell-Zell-Kontakt hergestellt hatten, ließ keine Beeinträchtigungen diesbezüglich erkennen. BEM-1 ist somit für die Bildung der Fusionspore nicht essentiell. Die gerichteten Interaktionen der *Δbem-1* Keimlinge waren nicht nur reduziert, sondern auch zeitlich verzögert. Die in gleicher Weise zeitlich verzögerte Aktivierung der MAP Kinase MAK-2 könnte darauf hindeuten, dass BEM-1 die effiziente Aktivierung von MAK-2 unterstützt. Die Ergebnisse der Untersuchung zur subzellulären Lokalisation von MAK-2-GFP und SO-GFP Fusionsproteinen in interagierenden *Δbem-1* Keimlingen ließ vermuten, dass BEM-1 eine Funktion bei der Stabilisierung der intra- und interzellulären Kommunikation übernimmt. Analysen von Mutanten, bei denen einzelne BEM-1 Domänen deletiert wurden, zeigten, dass die PB-1 Domäne einen wesentlichen Einfluss auf die gerichteten Keimlingsinteraktionen hat und an der Definition der Sporengröße beteiligt ist. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit führten abschließend zu der Hypothese, dass das Signalprotein BEM-1 in *N. crassa* ein mögliches Bindeglied darstellt, welches die Zellpolaritätsmaschinerie mit MAP Kinase- und ROS-basierter Signaltransduktion koppelt. Auf diese Weise ist es an der Modulierung von positiven

und/oder negativen Rückkopplungsmechanismen beteiligt, welche es der Zelle ermöglichen auf effiziente Weise mit potentiellen Fusionspartnern zu kommunizieren und sich diesen mit vordringender Zellspitze durch fein abgestimmtes Ausrichten der Polaritätsachse zu nähern.

## Abstract

Cell fusion is essential for the reproduction and development of multicellular eukaryotes and underlies diverse processes such as fertilization or the development of bones, muscles and organs. Although cell fusion is involved in such variable processes, all of them share the same basic principles: perception of the partner cell, establishment of cell-cell contact, weakening and merger of the extracellular matrix or the cell wall and finally fusion of the plasma membranes. In the present work the filamentous fungus *Neurospora crassa* was employed as a model organism to investigate eukaryotic cell fusion. Germinating vegetative spores of *N. crassa* attract each other and fuse. To sense and locate each other, the germlings communicate probably *via* secreted signaling molecules. By adjusting the cellular growth of the germ tubes, cells establish the required physical contact. Earlier studies showed that during the phase of polarized, directed growth the cytoplasmic proteins MAK-2 and SO are oppositely recruited to the plasma membrane at the germ tube tips in an oscillating manner. This observation suggests a communication mechanism which is based on alternating signal sending and receiving. The homolog of the MAP kinase MAK-2 in *Saccharomyces cerevisiae* Fus3p is part of a MAP kinase signaling cascade which gets activated after binding of the mating pheromone to its cognate receptor. Within this process, the signaling protein Bem1p serves *via* its protein-protein interaction domains as a molecular adaptor between the MAP kinase module, the upstream components of the signaling cascade and the cell polarity machinery. Besides this, for homologous proteins in filamentous fungi an involvement in activation of ROS-generating NADPH oxidases has been shown. In this work, the respective *N. crassa* homolog BEM-1 has been identified. A  $\Delta bem-1$  mutant showed strong defects in vegetative germling and hyphal fusion. While 75 % of the wild type germ tubes interacted with each other tropically,  $\Delta bem-1$  germ tubes did not. Vegetative cell fusion between  $\Delta bem-1$  germlings was only possible *via* small fusion bridges, which are known as CATs. Besides this, the  $\Delta bem-1$  mutant produced less macroconidia which were of much bigger size compared to wild type. A BEM-1-GFP fusion protein was detected at tips of growing hyphae and germlings, as well as at septa. These observations suggest that BEM-1 might interact with components of the polarity machinery. An artificially N-terminally extended BEM-1-GFP fusion protein complemented the germling fusion defect but led to the formation of multiple polarity



axes during germination. This observation might suggest that BEM-1 acts in different molecular complexes during the different polarization events. During the tropic interactions of fusion germlings, BEM-1-GFP concentrated at the fusion point and formed a transient ring around the opening fusion pore. FRAP analyses showed that BEM-1 is still recruited from the cytoplasm although cell-cell contact has already been established. This observation suggests a function which is independent of directed growth. The quantification of the cell fusion efficiency of  $\Delta bem-1$  germlings, which had already made contact *via* CATs, revealed no adverse effect caused by a lack of BEM-1. This shows that BEM-1 is not essential for fusion pore formation. Tropic interactions of the  $\Delta bem-1$  germlings were not only reduced but also occurred delayed. With the same temporal delay, the MAP kinase MAK-2 was activated in the  $\Delta bem-1$  mutant. This correlation might suggest that BEM-1 promotes efficient MAK-2 activation. The analyses of MAK-2-GFP and SO-GFP fusion proteins in tropically interacting  $\Delta bem-1$  germlings suggested a function of BEM-1 in stabilizing the intra- and intercellular communication. Analyses of mutants, in which individual protein domains present in BEM-1 were deleted, revealed that the PB-1 domain has strong impact on tropic germling interactions and on spore size definition. In conclusion the results of this work suggest that the signaling protein BEM-1 is a potential molecular adaptor which couples cell polarity with MAP kinase- and ROS-based signal transduction in *N. crassa*. In this way it might modulate positive and/or negative feedback loops which enables efficient communication between the fusion partners and promotes directed growth and the subsequent merger.

# Einleitung

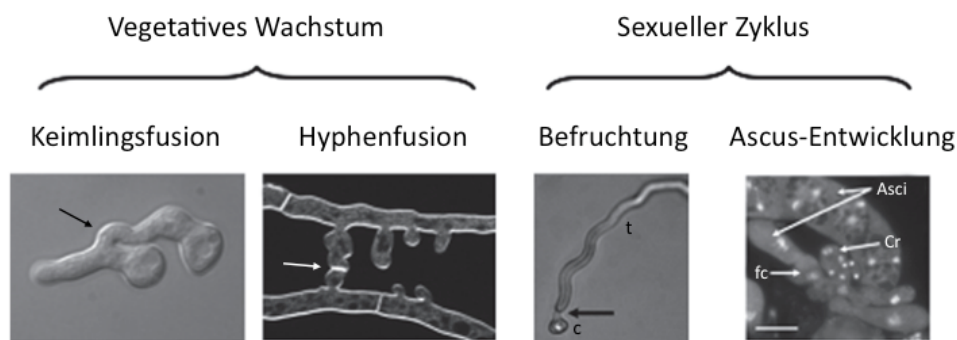
## 1.1 Zell-Fusion und ihre Bedeutung für höher entwickeltes vielzelliges Leben

Zellen gezielt miteinander zu fusionieren ist eine für Fortpflanzung und Entwicklung essentielle Eigenschaft vielzelliger Organismen (Avinoam & Podbilewicz, 2011, Chen *et al.*, 2007, Chen & Olson, 2005, Podbilewicz, 2006). Zu den bekanntesten Beispielen in höher entwickelten Organismen zählen die Fusion von Spermium und Eizelle während der Befruchtung, die Bildung von synzytischen Osteoklasten (Osteogenese), Fusion von Myoblasten (Muskeldifferenzierung) sowie die Fusion von Trophoblasten (plazentale Entwicklung) (Chen & Olson, 2005, Shemer & Podbilewicz, 2003). Darüber hinaus spielt Zell-Fusion eine Rolle bei der Entwicklung diverser Arten maligner Tumore, der Modulierung der Immun-Antwort (Fusion von Makrophagen) sowie bei der Stammzell-vermittelten Geweberegeneration. Die der Zell-Fusion unterliegenden molekularen Prozesse sind angesichts ihrer großen Bedeutung bisher nur unzureichend verstanden. Zell-Fusion, welche auch als Zell-Zell-Fusion bezeichnet wird, ist nicht zu verwechseln mit der besser untersuchten Vesikel-Membranfusion über sogenannte v-SNARE- und t-SNARE-Proteine oder der durch eine ähnliche Art von Fusogenen vermittelten Virus-Wirtszell-Fusion (Carr & Rizo, 2010, Chen & Olson, 2005, Earp *et al.*, 2005, Wickner & Schekman, 2008). Trotz der diversen Prozesse, in denen Zell-Fusion involviert ist, finden sich in jedem die folgenden Grundprinzipien wieder: Wahrnehmung der Partnerzelle, Herstellung des Zell-Zell-Kontakts, Auflösen und Vereinigen von extrazellulärer Matrix bzw. Zellwand sowie in letzter Konsequenz das Verschmelzen der Plasmamembranen.

## 1.2 Zell-Fusion im Modellorganismus *N. crassa*

Die Erforschung von Zell-Fusionsprozessen in diversen Modellorganismen erbrachte bereits wertvolle Erkenntnisse über die zugrundeliegenden molekularen Zusammenhänge. Darunter *Caenorhabditis elegans* (Fusion von Epithelzellen), *Drosophila melanogaster* (Myoblasten-Fusion) und *Saccharomyces cerevisiae* (Zygotenbildung bei der Paarung). Unter den filamentösen Pilzen avancierte in den letzten Jahren der gut etablierte Modellorganismus *Neurospora crassa* zu einem

vielversprechenden Paradigma für die Erforschung von eukaryotischer und Pilz-spezifischer Zell-Fusion (Fleissner, 2012). Zell-Fusion spielt eine besondere Rolle bei der Fortpflanzung und Entwicklung vieler filamentöser Pilze. In *N. crassa* finden Zellfusions-Ereignisse in allen Stadien des Lebenszyklus statt und dienen dabei unterschiedlichen Zielen. Keimende vegetativen Sporen (Makrokonidien) stellen durch gerichtetes Wachstum untereinander Zell-Zell-Kontakt her und fusionieren miteinander (Abb. 1.1). Hierbei kommunizieren sie vermutlich mithilfe von sekretierten Signalmolekülen, welche es ihnen erlauben den Fusionspartner aufzuspüren. Die Fusion von vegetativen Sporen korreliert mit einer schnelleren Entwicklung der jungen Pilzkolonie. Eine attraktive Hypothese ist daher, dass sie einzelnen Individuen bei der Eroberung von neuen Habitaten möglicherweise einen Vorteil gegenüber Konkurrenten verschafft (Richard *et al.*, 2012, Roca *et al.*, 2003).



**Abb. 1.1: Zellfusions-Ereignisse während vegetativer und sexueller Entwicklung in *N. crassa*.** A und B, Pfeile markieren vegetative Zell-Fusion von Keimlingen (A) und reifen Hyphen (B). C, Pfeil markiert Fusion einer Trichogyne (t) mit einer Konidiospore (c) unterschiedlichen Paarungs-Typs. D, Voraussetzung für die Bildung eines Ascus ist ein Zell-Fusions-Ereignis in der ascogenen Hyphe (Cr, Crozier), wodurch ein fusionierter Crozier (fc) entsteht. Verändert nach Fleissner *et al.*, 2008.

In der reifen Kolonie führt das Fusionieren von querverzweigenden Hyphenästen zur Bildung eines Myzels, welches sich mit einem reich verzweigten Netzwerk vergleichen lässt (Abb. 1.1). *N. crassa* ist ein Vertreter der filamentösen Ascomyceten, welche gemeinsam haben, dass ihre Zellen durch nicht vollständig geschlossene Septen voneinander getrennt sind und ein schlauchartiges Synzytium bilden, in welchem Organellen, Nährstoffe, Metabolite und Signalkomponenten frei wandern und geteilt werden. Der selektive Vorteil innerhalb dieses verzweigten Schlauchsystems Querverbindungen durch Hyphenfusion herzustellen ist bisher

unklar. Diskutiert werden unter anderem die Begünstigung von Homöostase in der Pilzkolonie sowie eine erhöhte Widerstandsfähigkeit nach Verletzungen in Folge von mechanischer Beschädigung (Fleissner, 2012). Während der sexuellen Vermehrung von *N. crassa* fusionieren weibliche Befruchtungshyphen (Trichogynen) mit Konidien oder Hyphen eines Partners entgegengesetzten Paarungstyps (Fleissner *et al.*, 2008) (Abb. 1.1). Nach der Befruchtung findet Zell-Fusion während der Ascus-Bildung zwischen der letzten Zelle und der basalen Zelle der ascogenen Hyphe (Crozier) statt (Abb. 1.1). In der als Ascus bezeichneten Zelle bilden sich nach erfolgter Karyogamie und Meiose die Ascosporen (Raju, 2009).

Eine in den letzten Jahren merklich zunehmende Anzahl an Studien brachte eine mittlerweile nicht unerhebliche Fülle an Mutanten mit Zellfusions-Defekten hervor (Fleissner *et al.*, 2009a, Fleissner *et al.*, 2005, Fleissner *et al.*, 2008, Fu *et al.*, 2011, Glass *et al.*, 2000, Maerz *et al.*, 2008, Pandey *et al.*, 2004, Simonin *et al.*, 2010, Xiang *et al.*, 2002). Während einige Mutanten Defekte in der Keimlings- und Hyphenfusion zeigen, jedoch keine Beeinträchtigungen in der sexuellen Entwicklung haben, gibt es wiederum Mutanten, welche in beiden Fortpflanzungs-Stadien Defekte aufweisen (Fleissner *et al.*, 2009a, Fleissner *et al.*, 2005, Simonin *et al.*, 2010). Derzeit ist noch ungeklärt, ob die unterschiedlichen Zellfusions-Prozesse in der vegetativen und sexuellen Fortpflanzung einen gemeinsamen molekularen Mechanismus teilen (Fleissner *et al.*, 2008). Die Klärung dieser Frage ist von generellem Interesse, da sie erhebliches Potenzial hat, Einblick in die Grundprinzipien von Zell-Fusion in filamentösen Pilzen zu geben. Soweit dies im Einzelfall untersucht wurde, weisen alle Mutanten, welche in der vegetativen Fusion betroffenen sind, sowohl Defekte in der Keimlingsfusion als auch in der Hyphenfusion auf (Fleissner, 2012). Diese Beobachtung führte zu der Hypothese, dass beiden Prozessen identische oder zumindest sehr ähnliche molekulare Mechanismen zugrunde liegen.

Zwei der am detailliertesten untersuchten Mutanten mit Defekten in vegetativer Zell-Fusion stehen im Zusammenhang mit den Proteinen MAK-2 und SO (Fleissner & Glass, 2007, Fleissner *et al.*, 2009b, Fleissner *et al.*, 2005, Pandey *et al.*, 2004). Die mitogen aktivierte Proteinkinase MAK-2 ist ein Homolog des Fus3p-Proteins aus *S. cerevisiae*, welches für die Hefe-Paarung essentiell ist (Elion *et al.*, 1990, Schrick *et al.*, 1997). Die molekulare Funktion von SO ist hingegen bisher unbekannt. SO ist in der Gruppe der filamentösen Ascomyceten konserviert, aber nicht vertreten in

einzelligen Pilzen wie *S. cerevisiae* und *Schizosaccharomyces pombe*. In der vegetativen Zell-Fusion in *N. crassa* spielen sowohl MAK-2 als auch SO vermutlich eine Rolle bei der Zell-Zell-Kommunikation (Fleissner *et al.*, 2009b). MAP Kinasen sind gewöhnlich Teil eines Signaltransduktions-Moduls, welches aus drei hintereinander geschalteten Kinasen besteht, die sich nacheinander durch sequentielle Phosphorylierung aktivieren (Neiman & Herskowitz, 1994). Fus3p ist in *S. cerevisiae* das unterste Glied einer sogenannten MAP Kinase Kaskade. Es wird von der MAP Kinase Kinase Ste7p aktiviert, welche wiederum durch die MAP Kinase Kinase Kinase Ste11p in den aktiven Zustand versetzt wird. Dieses MAPK Modul dient bei der Hefe-Paarung zur intrazellulären Weiterleitung des Signals, welches durch die Bindung des Paarungs-Pheromons an den in der Zellmembran befindlichen G-Protein-gekoppelten Rezeptor ausgelöst wird (Bardwell, 2004). Die homologen Vertreter von Ste7p (STE-7) und Ste11p (NRC-1) sind in *N. crassa* ebenfalls essentiell für die vegetative Keimlings- und Hyphenfusion (Maerz *et al.*, 2008, Pandey *et al.*, 2004).

Neben der MAK-2 MAP Kinase Kaskade gibt es weitere Signaltransduktions-Wege, für die eine essentielle Rolle in der vegetativen Zell-Fusion beschrieben wurde. *N. crassa* besitzt insgesamt drei unterschiedliche MAP Kinase Module. Zusätzlich zu dem MAK-2 Modul wurde eine OS-2 Kaskade und eine MAK-1 Kaskade identifiziert (Borkovich *et al.*, 2004). Die OS-2-Signaltransduktion wird in Gegenwart von osmotischem Stress aktiviert, während das MAK-1 Modul Kernstück des Zellwand-Integritäts-Weges ist. Ähnlich wie MAK-2 sind sowohl OS-2 als auch MAK-1 einschließlich ihrer stromaufwärts befindlichen Kinasen essentiell für die vegetative Zell-Fusion in *N. crassa* (Maerz *et al.*, 2008). Eine Fusionsmutante, welche im Zusammenhang mit der Regulation der Aktivität von MAP Kinasen zusammenhängen könnte, ist  $\Delta ham-5$  (Aldabbous *et al.*, 2010). Das Homolog des entsprechenden Genprodukts IDC-1 ist im filamentösen Pilz *Podospora anserina* verantwortlich für den NADPH-Oxidase-abhängigen MAP Kinase-Import in den Zellkern (Jamet-Vierny *et al.*, 2007).

Ebenso relevant für die vegetative Zell-Fusion in *N. crassa* sind Homologe von Komponenten des Far-Multiprotein-Komplexes (*ham-2*, *ham-3* und *ham-4*), welcher in *S. cerevisiae* in Gegenwart von Paarungs-Pheromon für das Anhalten des Zellzyklus in der G1-Phase verantwortlich ist (Fleissner, 2012). Ähnlich wie bei der Paarung in

Hefe scheint die Keimlingsfusion in *N. crassa* mit einem Kernteilungs-Arrest einherzugehen (Roca *et al.*, 2010). Mögliche Störungen in der Koordinierung von Kernteilung und Zell-Fusion könnten die Ursache für die beobachteten Zellfusions-Defekte sein (Fleissner, 2012). Das HAM-3-Homolog in Säugetieren ist ein Vertreter der Striatin-Familie und dient als Bindeglied zwischen Signaltransduktion und endozytotischem Apparat. Unter anderem ist es an der Bewegung von epithelialen Zellschichten beteiligt (Benoist *et al.*, 2006). Das menschliche HAM-4-Homolog SLMAP spielt eine wesentliche Rolle bei der Fusion von Myoblasten während der Muskelentwicklung (Guzzo *et al.*, 2004). Denkbar ist, dass sowohl HAM-3 als auch HAM-4 in filamentösen Pilzen und höheren Eukaryoten ähnliche Funktionen übernehmen (Simonin *et al.*, 2010).

Ein Zusammenhang zwischen transkriptioneller Regulation und vegetativer Zell-Fusion in *N. crassa* stellten Aldabbous *et al.* her, indem sie einen dimeren Transkriptionsfaktor (RCM-1/RCO-1) identifizierten. Über seine essentielle Funktion in der Zell-Fusion hinausgehend ist RCM-1/RCO-1 relevant für generelle Prozesse, welche für Wachstum und Entwicklung eine Rolle spielen (Aldabbous *et al.*, 2010).

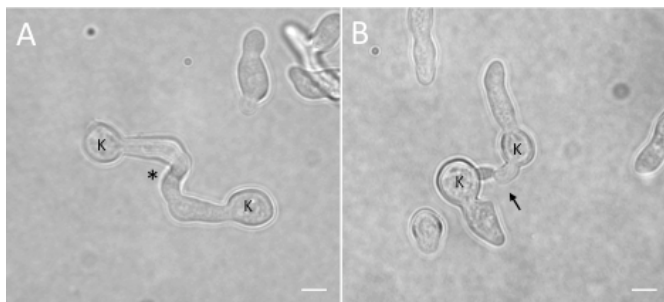
Ein mögliches Bindeglied zwischen der molekularen Zellfusions-Maschinerie und der Regulation von Zellpolarität könnte die kleine Rho-GTPase RAC-1 sein. Eine *rac-1* Mutante erwies sich in einem kürzlich durchgeführten *Screening* von *N. crassa*-Mutanten als essentiell für die vegetative Zell-Fusion (Fu *et al.*, 2011). RAC-1 ist eine Schlüsselkomponente bei der Regulation von Zellpolarität in filamentösen Pilzen und höheren Eukaryoten (Harris, 2011). Möglicherweise ist sie direkt daran beteiligt, die Ausrichtung des Zytoskeletts in gerichtet wachsenden Keimlingen und Hyphen zu steuern.

Im Zusammenhang mit der eigentlichen Zell-Zell-Fusion, d.h. der Vereinigung von Zellwänden und Membranen ist bisher nur eine einzige Mutante identifiziert worden. Fleissner *et al.* zeigten, dass das Transmembran-Protein PRM-1 sowohl in der sexuellen Paarungspartner-Interaktion als auch in der vegetativen Zell-Fusion eine signifikante Rolle bei der Verschmelzung der Plasmamembranen spielt, während es sich als irrelevant für das gerichtete Wachstum der Keimlinge erwies (Fleissner *et al.*, 2009a). Faktoren, welche eine Rolle in der späten Phasen der Zell-Fusion spielen, blieben möglicherweise aufgrund von funktionellen Redundanzen bisher unentdeckt.

Die Untersuchung von Mehrfach-Deletionsmutanten erscheint daher vielversprechend.

### 1.2.1 Die Keimlingsfusion erfordert gegenläufig oszillierende Rekrutierung der Proteine MAK-2 und SO zu den Zellspitzen

Im Fokus dieser Arbeit steht die vegetative Fusion von keimenden Makrokonidien, welche auch als Keimlingsfusion bezeichnet wird. Gekeimte Makrokonidien fusionieren entweder indem sie die Wachstumsrichtung ihrer Keimschläuche aufeinander ausrichten und diese Spitze an Spitze zueinander finden (Abb. 1.2, A) oder durch die Ausbildung von schmalen Fusionsbrücken, welche die Konidien direkt miteinander verbinden (Abb. 1.2, B). Letztere werden als *Conidial Anastomosis Tubes* (CATs) bezeichnet und sind im Vergleich zu den Keimschläuchen nicht in der Lage größere Distanzen zu überbrücken (Roca *et al.*, 2005).



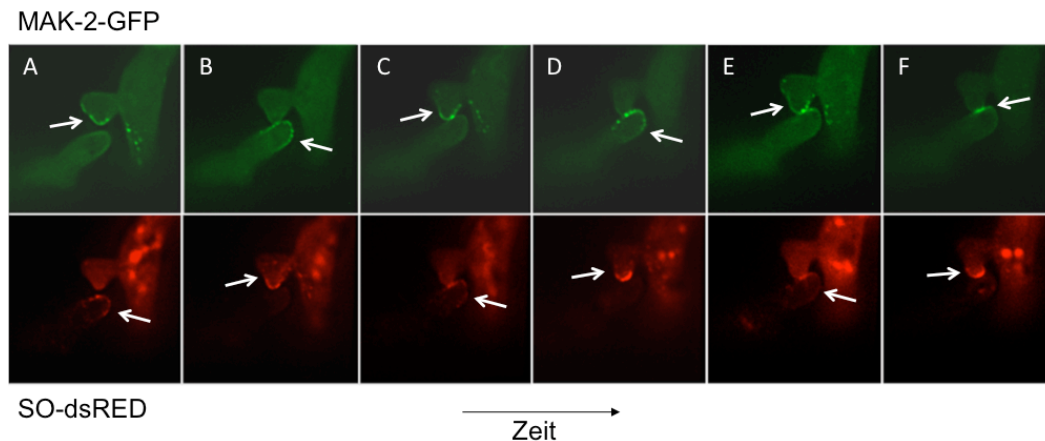
**Abb. 1.2: Vegetative Keimlingsfusion in *N. crassa*.** Keimende Konidiosporen (K) fusionieren mittels interagierender Keimschläuche (A) oder mithilfe von CATs (B). Sternchen markiert fusionierende Keimschlauchspitzen; Pfeil markiert fusionierende CATs. Gößenbalken = 5 µm.

Im Rahmen dieser Arbeit finden die der Keimlingsfusion zugrundeliegenden molekularen Mechanismen unter zwei verschiedenen Aspekten besondere Beachtung. Zum einen werden die Mechanismen in den Mittelpunkt gerückt, die der Zell-Zell-Kommunikation zur Wahrnehmung des Fusionspartners dienen, zum anderen solche, die der Polarisierung und Ausrichtung des zellulären Wachstums zur Herstellung des Zell-Zell-Kontakts unterliegen. Während die meisten fusionierenden Zellen in anderen Organismen entweder genetisch unterschiedlich sind oder sich in unterschiedlichen Entwicklungs-Stadien befinden, stellt die Kommunikation

zwischen genetisch identischen und gleich entwickelten *N. crassa* - Sporen eine besondere Herausforderung dar. Diese besteht darin, während der interzellulären Kommunikation zwischen dem eigenen sekretierten Signal und dem des Partners unterscheiden zu können. Fusionierende Makrophagen stehen während der Bildung eines vielkernigen Osteoklasten vermutlich vor einem ähnlichen Problem (Read *et al.*, 2009). Sie scheinen dies zu lösen, indem in einer Subpopulation die Expression des Rezeptors DC-STAMP durch das Zytokin RANKL ausgelöst wird. Dies lässt sie zu fusionskompetenten Gründerzellen werden, welche vermutlich ihre Partnerzellen anhand eines über den DC-STAMP-Liganden vermittelten chemischen Gradienten aufspüren (Ishii & Saeki, 2008, Vignery, 2005).

Entscheidende Hinweise auf einen Kommunikations-Mechanismus, welcher es vermutlich fusionierenden *N. crassa* - Keimlingen ermöglicht, zwischen dem eigenen Signal und dem des Partners unterscheiden zu können, kamen von Fleissner *et al.* 2009. In dieser Arbeit wurde gezeigt, wie die MAP Kinase MAK-2 und das SO-Protein während der gerichteten Interaktion von fusionierenden Keimlingen entgegengesetzt alternierend aus dem Zytoplasma an die Zellspitzen rekrutiert werden und dort ca. 300 nm große Komplexe bilden. Während MAK-2 an der Spitze des einen Partners akkumuliert, zeigt sich zur gleichen Zeit eine starke Anhäufung von SO in der Spitze des anderen Partners. Dissoziiert MAK-2 nach ca. 3-5 min von der Spitze, verschwindet auch SO an der Spitze des Partners. An Stelle von MAK-2 wird nun SO im ersten Partner rekrutiert während im zweiten Partner SO durch MAK-2 ersetzt wird. Dieser Vorgang wiederholt sich ca. 4-5 mal, bis die Fusionsspitzen Zell-Zell-Kontakt hergestellt haben und sowohl MAK-2 als auch SO an der Kontaktstelle akkumulieren (Abb. 1.3). Diese Beobachtung zeigt, dass sich die fusionierenden Zellen bis zur Kontaktaufnahme wechselweise in zwei verschiedenen physiologischen Zuständen befinden, von denen möglicherweise einer das Senden des Signals und der andere das Empfangen repräsentiert (Fleissner *et al.*, 2009b). Basierend auf bekannten Funktionen von MAP Kinasen ist die Annahme, dass die Rekrutierung von MAK-2 den Zustand des Empfangens repräsentiert, eine attraktive Hypothese (Fleissner, 2012).





**Abb. 1.3: Die MAP Kinase MAK-2 (grün) und das SO-Protein (rot) oszillieren entgegengesetzt an den Zellspitzen fusionierender *N. crassa* - Keimlinge.** Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen A-F repräsentieren eine Folge von Momentaufnahmen mit zeitlichen Abständen von 3-5 min zwischen den einzelnen Zeitpunkten. Fleissner *et al.*, nicht publizierte Daten.

Ein permanenter Wechsel zwischen Senden und Empfangen dürfte unbeweglichen, genetisch identischen und in ihrer Entwicklung gleichgestellten Zellen wie den *N. crassa*-Keimlingen eine effiziente Kommunikationsbasis bieten und gleichzeitig die nötige Flexibilität vermitteln, die es ihnen ermöglicht mit nahezu jedem potentiellen Partner in der erreichbaren Umgebung zu fusionieren (Fleissner *et al.*, 2009b, Read *et al.*, 2009). Eine zentrale Frage in diesem Zusammenhang ist die nach der Beschaffenheit des Signalmoleküls und des entsprechenden Rezeptors. Homologe der Paarungs-Pheromone und Rezeptoren von *S. cerevisiae* wurden in *N. crassa* identifiziert und sind essentiell für sexuelle Interaktionen, wie das gerichtete Wachstum der Trichogyne zu einer Pheromon-sekretierenden Konidiospore des Paarungspartners (Bobrowicz *et al.*, 2002, Fleissner, 2012). Kim und Borkovich zeigten jedoch, dass weder die Pheromone, welche für die sexuelle Paarung benötigt werden, noch die daran beteiligten G-Protein-gekoppelten Rezeptoren für vegetative Keimlings- und Hyphenfusionen essentiell sind (Kim & Borkovich, 2004, Kim & Borkovich, 2006). Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass sich sexuelle und vegetative Zell-Fusion unterschiedlicher Signalsubstanzen und Rezeptoren bedienen (Fleissner *et al.*, 2008). Darüber hinaus wiesen die Mutanten, welche die einzigen vorhandenen G-Protein-Untereinheiten G $\beta$ , G $\gamma$  und die drei G $\alpha$ -Proteine betreffen, keine Defekte in der vegetativen Keimlings- und Hyphenfusion auf (Kays & Borkovich, 2004, Fleissner & Glass, nicht publizierte Daten). Dies zeigt, dass die

vegetative Zell-Fusion nicht auf G-Protein-vermittelter Signaltransduktion beruht (Fleissner, 2012).

Weitere relevante Fragen, welche die molekularen Mechanismen der vegetativen Keimlingsfusion in *N. crassa* betreffen seien hier abschließend genannt. Die Klärung dieser Fragen hat erhebliches Potenzial wesentlich zu unserem Verständnis von eukaryotischer Zell-Zell-Kommunikation und Zell-Fusion beizutragen.

*Wie können zwei genetisch identische Individuen ihre zelluläre Kommunikation so aufeinander abstimmen, dass sie genau um eine halbe Phase versetzt senden und empfangen?*

*Welche Mechanismen liegen der schnellen Translozierung von MAK-2 und SO zugrunde und wie wird der Wechsel zwischen Senden und Empfangen erreicht?*

*Wie werden Signalspezifität und - Intensität von MAP Kinasen moduliert?*

### 1.3 Zellpolarität in filamentösen Pilzen - ein Überblick

Eine Zelle kann als polarisiert angesehen werden, sobald eine spezifische subzelluläre Komponente wie ein Proteinkomplex oder ein Organell in der Zelle in asymmetrischer Weise verteilt ist (Harris, 2006). Polarität ist eine fundamentale Eigenschaft, welche der Morphogenese und der Entwicklung geradezu aller bekannten Zellen unterliegt (Etienne-Manneville, 2004). Jede Fragestellung, welche mit Zell-Polarität im Zusammenhang steht, kann einem der drei Haupt-Themen zugeordnet werden: Ausbildung (1), Aufrechterhaltung (2) oder Ausrichtung von Polarität auf externe Reize (3). Das Signalprotein Bem1p (*bud emergence*) spielt in *S. cerevisiae* sowohl für Ausbildung, Aufrechterhaltung und Ausrichtung von Zellpolarität eine wesentliche Rolle. Aufgrund der geplanten Charakterisierung seines Homologs BEM-1 in *N. crassa* sowie der generellen Relevanz von Zellpolarität hinsichtlich jeglicher Art von Zell-Fusion wird an dieser Stelle ein kurzer Überblick über Zellpolarität im Modell „filamentöser Pilz“ geboten. Im Reich der Pilze gibt es klare Unterschiede zwischen der monomorphen Hefe *S. cerevisiae*, welche kurz und sporadisch Polarität ausbildet und den filamentösen Pilzen, die sich durch kontinuierliches, multi-axiales polares Wachstum auszeichnen (Harris and Momany 2004). Filamentöse Pilze sind nicht in der Lage sich frei zu bewegen. Da die meisten unter ihnen aber entweder saprophytisch oder parasitär leben, ist es vor allem das stark polarisierte Wachstum, welches ihnen den entscheidenden Vorteil dabei verschafft, in noch nicht besiedelte Habitate vorzudringen und neue Nahrungsquellen zu erschließen. Aufgrund dieser stark ausgeprägten Adaption werden filamentöse Pilze als Spezialisten für hoch polarisiertes Wachstum angesehen.

Das folgende Kapitel bietet zunächst einen Überblick über Ausbildung und Aufrechterhaltung von Zellpolarität in filamentösen Pilzen. Nachfolgend werden beispielhaft einige Mutationen und Deletionen mit unterschiedlichen Auswirkungen auf die Zellpolarität filamentöser Pilze behandelt. Abschließend wird der Bildung vegetativer Sporen in *N. crassa* besonderer Stellenwert eingeräumt, da die Knospung in *S. cerevisiae*, für die Bem1p essentiell ist, deutliche Gemeinsamkeiten mit den Prozessen aufweist, welche der asexuellen Sporenbildung unterliegen.

### 1.3.1 Ausbildung und Aufrechterhaltung von Zellpolarität

Die Etablierung einer neuen Zellpolaritätsachse spielt in filamentösen Pilzen eine Rolle bei der Sporenbildung, der Sporenkeimung und der Bildung von Querverzweigungen an einer bereits polar wachsenden Hyphe (Harris, 2006, Harris, 2008, Momany, 2002). Zur Initiierung des polaren Wachstums filamentöser Pilze bildet sich, ähnlich wie in *S. cerevisiae*, ein membranständiges Cluster von aktivierten Rho-GTPasen aus, welche mithilfe ihrer Effektoren die Polarisierung des Zytoskeletts steuern und die räumliche Organisation des sekretorischen Apparats dirigieren. Die Rho-GTPase Cdc42p gilt in Hefe als einer der Hauptregulatoren von Zellpolarität. Filamentöse Pilze besitzen allerdings im Gegensatz zu *S. cerevisiae* zusätzlich zu einem Cdc42p-Homolog als weitere Rho-GTPase ein Rac-1-Homolog (Harris, 2006, Levin, 2005). Welche Funktionen die beiden Proteine hinsichtlich der Regulation von Zellpolarität übernehmen variiert zum Teil recht stark zwischen den einzelnen Spezies (Harris, 2011). Eine kürzlich veröffentlichte Studie deutet darauf hin, dass CDC-42 in *N. crassa* bei der Ausbildung von Zellpolarität eine wesentliche Bedeutung zukommt, während RAC-1 eher für die Aufrechterhaltung der Polarität wichtig zu sein scheint (Araujo-Palomares *et al.*, 2011)

Vor der Hefe-Knospongung wird der Ort der neuen Knospe durch fest sitzende Landmarken-Proteine definiert. In filamentösen Pilzen ist jedoch noch nicht klar, ob während der Sporenkeimung ähnliche Landmarken-Proteine eine Rolle spielen oder ob es sich bei diesem Prozess um Landmarken-unabhängiges Symmetrie-Brechen handelt (Harris, 2006, Harris & Momany, 2004, Momany, 2002, Riquelme *et al.*, 2011) (vgl. EL, Abschnitt 1.5.1.1). Nach der Sporenkeimung bleibt die lokale Konzentration der wesentlichen Zellpolaritäts-Komponenten an der jungen Keimschlauchspitze erhalten, wodurch die kontinuierliche Verlängerung des Keimschlauchs gewährleistet wird (Momany, 2002). Dennoch scheinen sich diverse Veränderungen zu ergeben, während der Keimschlauch zu einer reifen Hyphe heranwächst und sein Durchmesser an Größe gewinnt (Araujo-Palomares *et al.*, 2007, Araujo-Palomares *et al.*, 2011, Sudbery, 2011). In jungen langsam wachsenden Hyphen von *Ashbya gossypii* lokalisiert ein als Polarisom bezeichneter Proteinkomplex als Kappe an der Hyphenspitze, während es in schnell wachsenden reiferen Hyphen zusätzlich eine globuläre Struktur im Apex der Hyphen ausbildet (Sudbery, 2011). Das Polarisom ist ein für die Zellpolarität essentieller Komplex (Ozaki-Kuroda *et al.*, 2001, Sheu *et al.*,

1998). Es wurde zuerst in *S. cerevisiae* beschrieben und besteht aus den Proteinen Spa2p, Pea2p und Bud6p/Aip3p. Das Polarisom agiert stromabwärts vom Cdc42p-Modul und reguliert die Lokalisierung des Formins Bni1p. Letzteres ist ein essentieller Faktor für die Polymerisierung des Aktins und wird durch die enge Verbindung zum Polarisom häufig ebenfalls als Polarisom-Komponente angesehen (Harris, 2006, Harris & Momany, 2004, Sagot *et al.*, 2002).

Passend zu den Beobachtungen in *A. gossypii* deuten andere Studien darauf hin, dass eine wesentliche Veränderung in heranreifenden Hyphen die Ausbildung eines sogenannten Spitzenkörpers ist, welcher als solcher erst dann detektierbar ist, wenn die Keimschläuche eine Länge von etwa 150 µm erreicht haben (Araujo-Palomares *et al.*, 2007, Sanchez-Leon *et al.*, 2011). Der Spitzenkörper ist ein hoch dynamisches, globuläres Gebilde, welches aus Vesikeln und anderen zellulären Bestandteilen wie Mikrotubuli, Aktinfilamente und Polysomen besteht (Harris, 2006). Die Position des Spitzenkörpers in den Hyphenspitzen korreliert mit der Richtung, in welche die Hyphe verlängert wird (Girbardt, 1957). Detaillierte Untersuchungen zeigten, dass der Spitzenkörper unmittelbar die polare Ausrichtung einer Hyphe beeinflusst, während Mikrotubuli dafür benötigt werden, seine Position zu stabilisieren (Riquelme *et al.*, 1998). Eine wesentliche Funktion des Spitzenkörpers scheint darin zu bestehen, sekretorische Vesikel zu sortieren, welche entlang von Mikrotubuli aus dem Inneren der Hyphe herbei geschafft wurden, um diese dann entlang von Aktinfilamenten ihrem Bestimmungsort an der Hyphenspitze zukommen zu lassen (Harris, 2006, Riquelme *et al.*, 2011). Die Polarisom-Komponente SepA (Bni1p) formiert sich in *A. nidulans* als Kappe an der Spitze von Keimschläuchen und reifen vegetativen Hyphen und bildet etwas subapikal im Zentrum der Kappe eine kugelförmige Struktur aus, welche im Spitzenkörper lokalisiert (Sharpless & Harris, 2002). In einer  $\Delta bema$  (*bem-1*) Mutante zeigte sich SepA-GFP stark delokalisiert (Leeder & Turner, 2008). Diese Beobachtung führte Leeder und Turner zu der Vermutung, dass BemA in *A. nidulans* möglicherweise für die Organisation des gesamten Spitzenkörpers verantwortlich ist.

### 1.3.2 Defekte in Ausbildung und Aufrechterhaltung von Zellpolarität

Defekte, welche die Zellpolarität betreffen, können sich in vielerlei Hinsicht auf die Hyphenmorphologie auswirken. Eine Deletion von *bemA* (*bem-1*) führte sowohl in *A. nidulans* als auch in *Epichloë festucae* zu Schwellungen an den Spitzen der vegetativen Hyphen (Leeder & Turner, 2008, Takemoto *et al.*, 2011). Ein deutlich vergrößerter Hyphendurchmesser zeigte sich aufgrund von Defekten verursacht durch eine *rasA* Deletion in *Aspergillus fumigatus* (Fortwendel *et al.*, 2008). Hyphen von unregelmäßig gewellter Gestalt waren das Ergebnis einer *spa-2* Deletion in *N. crassa* und sind vermutlich auf eine Destabilisierung des Spitzenkörpers in der  $\Delta$ *spa-2* Mutante zurückzuführen (Araujo-Palomares *et al.*, 2009). Bestimmte Polaritätsdefekte in filamentösen Pilzen bewirken eine stärkere Verzweigung der Hyphen. In so einem Fall ist das Aufrechterhalten der Polaritätsachse gestört. Vergleichbares zeigte sich in der temperatursensitiven *N. crassa cot-1* Mutante, bei welcher die Dbf2-ähnlichen Kinase COT-1 betroffen ist (Maerz *et al.*, 2008, Yarden *et al.*, 1992, Ziv *et al.*, 2009). Weitere Beispiele für hyperververzweigtes Hyphenwachstum in filamentösen Pilzen sind die  $\Delta$ *rac* und die  $\Delta$ *cla4* Mutante in *C. purpurea* (Rolke & Tudzynski, 2008) sowie die  $\Delta$ *rasA* Mutante in *A. fumigatus* (Fortwendel *et al.*, 2008).

### 1.3.3 Die Bildung vegetativer Sporen in *N. crassa*

Eine *bem-1* Deletion in *S. cerevisiae* führt aufgrund eines Defektes in der Knospenbildung zu großen, vielkernigen, meist unförmigen Zellen (Chenevert *et al.*, 1992). *N. crassa* produziert zwei Sorten asexueller Sporen, deren Bildung deutliche Gemeinsamkeiten mit der Knospung in *S. cerevisiae* aufweist. Während Makrokonidien durchschnittlich 5-8  $\mu$ m groß sind und in der Regel 2-4 Zellkerne enthalten, sind Mikrokonidien mit nur 2,5-3,5  $\mu$ m deutlich kleiner und enthalten jeweils nur einen Kern.

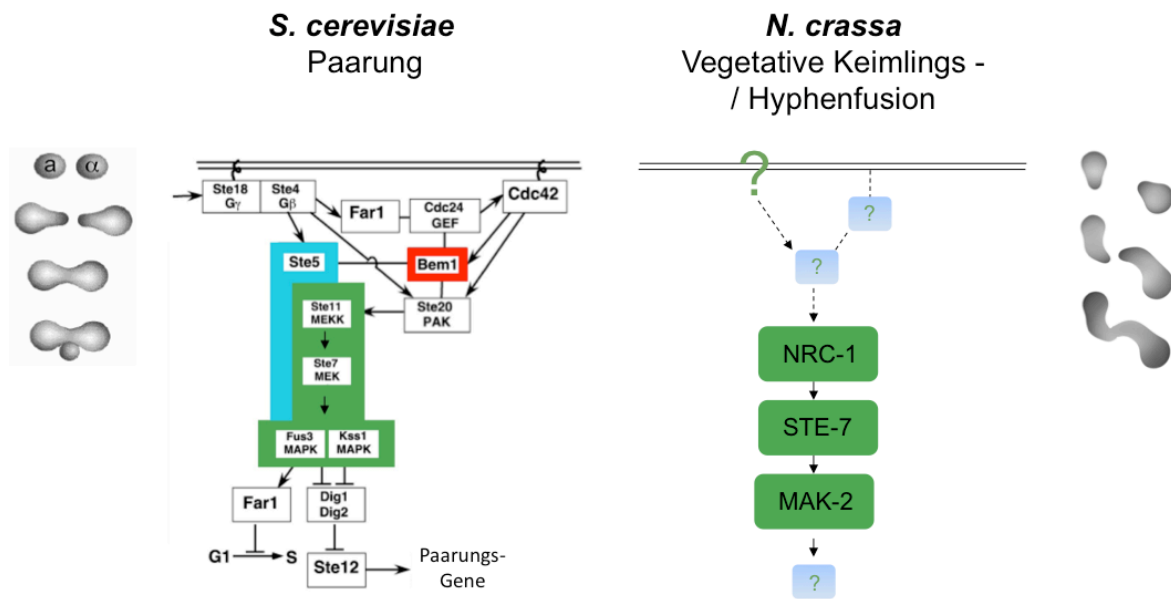
Makrokonidien entstehen durch wiederholte apikale Knospung an spezialisierten Lufthyphen (Springer & Yanofsky, 1989). Entwickelt sich eine Lufthyphye in einen Sporenträger, ein sogenanntes Konidiophor, beginnt die Hyphenspitze zunächst alternierend polar und apolar zu wachsen. Dies führt zu einer prokonidialen Kette, welche einer Perlenkette ähnelt. Im nächsten Entwicklungsschritt werden zwischen den einzelnen konidialen Abschnitten Doppelsepten eingeführt. Bei weiterer

Ausdifferenzierung trennen sich die reifen Konidien, indem sich die Doppelsepten voneinander lösen. Hervorgehoben sei, dass die Sporenvorläuferzellen gezwungen sind bei jedem Wechsel zwischen polarem und apolarem Wachstum ihr morphogenetisches Programm dementsprechend umzulenken. Vergleichbare Wechsel zwischen polarem und apolarem Wachstum finden sich auch bei der Knospung von *S. cerevisiae* (Chant, 1994).

Im Gegensatz zu Makrokonidien entstehen Mikrokonidien nicht an spezialisierten Lufthyphen, sondern an vegetativen Hyphen im Inneren der Pilzkolonie (Springer, 1993). An der Zellwand der Hyphe bildet sich zunächst eine kleine laterale Ausstülpung. Um diese Stelle herum formiert sich daraufhin ein Kragen aus stärker vernetztem Zellwandmaterial. Das sich neu bildende Mikrokonidium befindet sich unter dieser Ausstülpung und bricht bei fortschreitender Entwicklung durch die Zellwand. Das an dieser Stelle entstandene Loch dient daraufhin als Ausgangstor für weitere Mikrokonidien. Bei diesem Prozess schnürt das Konidiophor jedes Mal einen Teil seines Zytoplasmas durch die Bildung eines neuen Septums ab und verpackt es in ein Mikrokonidium, welches somit als eine Art polar wachsende Knospe betrachtet werden kann. In der Regel wird jedes Konidium mit einem Kern ausgestattet. Es kommt jedoch auch vor, dass sich kernlose Kompartimente auf diese Art abschnüren. Am Ende bleibt das Konidiophor als eine leere vakuolisierte Hülle zurück.

#### **1.4 Signaltransduktion der Paarungs-Pheromon-Antwort in *S. cerevisiae***

Wie bereits beschrieben, bedienen sich die sexuelle Paarung in *S. cerevisiae* und die vegetative Keimlingsfusion in *N. crassa* offensichtlich eines ähnlichen MAP Kinase Moduls zur Reizweiterleitung (vgl. EL, Abschnitt 1.2). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Funktion der Signalkomponente BEM-1 während der Keimlingsfusion in *N. crassa* zum zentralen Thema gemacht. Das Homolog Bem1p übernimmt in *S. cerevisiae* während der Paarung eine essentielle Rolle bei der Verknüpfung von MAP Kinase-basierter Signaltransduktion und der Regulation von Zellpolarität (Abb. 1.4) (Chenevert *et al.*, 1992, Lyons *et al.*, 1996).



**Abb. 1.4:** Der Signalweg der Paarungs-Pheromon-Antwort in *S. cerevisiae* teilt Schlüsselkomponenten mit dem Signalweg der vegetativen Keimlings- und Hyphenfusion in *N. crassa*. Zu untersuchen, ob BEM-1 in letzterem eine Funktion übernimmt ist Gegenstand der vorliegenden Arbeit. MEK = MAPK/ERK Kinase; ERK = extracellular signal-regulated kinase). Weitere Erläuterungen siehe Text. Abbildung verändert nach Bardwell 2004 und Leeder *et al.* 2011.

BEM-1 ist daher ein vielversprechender Kandidat, welcher möglicherweise in der Keimlingsfusion von *N. crassa* involviert ist. Die Untersuchung seiner Funktion könnte dabei helfen, Klarheit über die molekularen Zusammenhänge im stromaufwärts befindlichen Teil der MAK-2-Signalkaskade zu verschaffen. Eine zentrale Frage ist hierbei von übergeordnetem Interesse:

*Wie koordiniert die interagierende Zelle die Ausrichtung ihres Wachstums mit intra- und interzellulärer Signalgebung und - Weiterleitung?*

Nachfolgend wird die sexuelle Paarungs-Partner-Interaktion in der einzelligen Hefe *S. cerevisiae* etwas ausführlicher behandelt. Die Paarung in Hefe ist ein detailliert untersuchtes System und stellt aufgrund der Parallelen zur vegetativen Keimlingsfusion in *N. crassa* ein brauchbares Paradigma dar. Unter sexueller Paarung versteht man in *S. cerevisiae* die durch Zell-Fusion herbeigeführte Vereinigung von haploiden Zellen und der darauf folgenden Karyogamie (Knop, 2011). Da sich Hefezellen ähnlich wie die Konidiosporen von *N. crassa* *per se* nicht fortbewegen



können, richten sie zur Herstellung des für die Paarung notwendigen Zell-Zell-Kontakts ihr Wachstum auf den Paarungspartner aus. Ein wesentlicher Unterschied zur vegetativen Zell-Fusion in *N. crassa* ist, dass die fusionierenden Hefezellen genetisch unterschiedlich sind und mit unterschiedlichen Signalsubstanzen den Partner anlocken (Knop, 2011). Zur Herstellung des genetischen Unterschieds am Paarungstyp-Locus (*mating type locus*) bedient sich *S. cerevisiae* Genkonversions- und Gen-Silencing-Mechanismen, welche wiederum zur Produktion von Proteinen führen, die den Zelltyp spezifizieren und für die Paarungs-Interaktion benötigt werden (Haber, 1998, Nasmyth, 1982). Die auf diese Weise definierten Paarungstypen *MATa* und *MAT $\alpha$*  sind in der Lage potentielle Paarungspartner entgegengesetzten Paarungstyps in einem Pheromon-Gradienten zu orten. Beide Paarungstypen nutzen hierbei unterschiedliche Substanzen, um den Partner anzulocken. Paarungstyp *MAT $\alpha$*  produziert den  $\alpha$ -Faktor, ein Peptidhormon, welches über den sekretorischen Weg aus der Zelle befördert wird. Paarungstyp *MATa* produziert hingegen den a-Faktor, ein durch Fettsäuren modifiziertes und damit stark lipophiles Peptid, welches zytoplasmatisch produziert wird und über einen ABC-Transporter aus der Zelle ausgeschleust wird (Knop, 2011). Sobald das Paarungs-Pheromon des entgegengesetzten Paarungstyps an seinen Rezeptor bindet, wird ein heterotrimeres G-Protein aktiviert (Bardwell, 2004) (siehe Abb. 1.4). Der hierdurch beschrittene Weg der intrazellulären Reizweiterleitung wird als Signalweg der Paarungs-Pheromon-Antwort bezeichnet (*mating pheromone response pathway*). Das durch den Rezeptor aktivierte G-Protein besteht aus den Untereinheiten  $G\alpha$ ,  $G\beta$  und  $G\gamma$  (Gpa1p, Ste4p und Ste18p). Seine Aktivierung geschieht durch den Austausch von GDP zu GTP, welche durch die Pheromon-induzierte Konformationsänderung begünstigt wird (Dohlman, 2002). Dieser Nukleotid-Austausch bewirkt die Dissoziation der  $G\alpha$ -Untereinheit vom  $G\beta\gamma$ -Komplex, welcher über kovalent gebundene Lipid-Gruppen (Farnesyl und Palmitoyl) mit der Membran verankert ist. Der  $G\beta\gamma$ -Komplex bindet mithilfe der vorher von  $G\alpha$  maskierten Bindestellen an drei verschiedene Effektoren. Dies ermöglicht eine Signalweiterleitung, welche eine Aktivierung der partiell redundanten MAP Kinasen Fus3p und Kss1p bewirkt (Bardwell, 2004).  $G\beta\gamma$  bindet die p21-aktivierte Kinase (PAK) Ste20p und gewährleistet durch die gleichzeitige Bindung an den Far1p/Cdc24p-Komplex die lokale Aktivierung der kleinen Rho GTPase Cdc42p, welche wiederum Ste20p aktiviert (Ash *et al.*, 2003, Butty *et al.*,

1998, Drees *et al.*, 2001, Johnson, 1999, Leberer *et al.*, 2000, Nern & Arkowitz, 1999). Far1p übernimmt dabei die Rolle des Adapters und verbindet G $\beta\gamma$  mit dem *Guanine nucleotide exchange factor* (GEF) Cdc24p. Letzterer aktiviert Cdc42p, indem er den Austausch von GDP zu GTP fördert. Cdc42p ist wie G $\beta\gamma$  durch einen Lipid-Anker (Geranylgeranyl) mit der Membran verbunden und bindet im aktivierten Zustand an die CRIB-Domäne von Ste20p (CRIB = *Cdc42 and Rac interaction*). Durch diese Bindung wird die Autoinhibierung der Kinase aufgehoben. Das jetzt aktivierte Ste20p phosphoryliert darauf die MAP Kinase Kinase Kinase (MAPKKK) Ste11p und sorgt damit für dessen Aktivierung (Drogen *et al.*, 2000). Ste11p ist die erste Kinase einer MAP Kinase Kaskade. Es aktiviert wiederum die MAPKK Ste7p durch Phosphorylierung (Neiman & Herskowitz, 1994), woraufhin aktiviertes Ste7p die Phosphorylierung der MAP Kinasen Fus3p und Kss1p bewirkt (Bardwell *et al.*, 1996). Um das MAP Kinase Modul in die Nähe der aktivierten Proteinkinase Ste20p zu bringen, bindet die G $\beta\gamma$ -Untereinheit zusätzlich an Ste5p, welches als Gerüstprotein die drei Kinasen Ste11p, Ste7p und Fus3p (bzw. Kss1p) bindet und sie sterisch passend zueinander ausrichtet (Pryciak & Huntress, 1998). Auf diese Art und Weise ermöglicht die simultane Bindung von G $\beta\gamma$  an Ste20p, Far1p/Cdc24p und Ste5p eine örtlich begrenzte Signalweiterleitung vom aktivierten Pheromonrezeptor hin zu den untersten MAP Kinasen Fus3p und Kss1p. Beide aktivierten Kinasen phosphorylieren sowohl den Transkriptionsfaktor-Komplex Ste12p/Dig1p/Dig2p als auch das Far1p-Protein (Gartner *et al.*, 1998, Gartner *et al.*, 1992). Durch die Phosphorylierung von Ste12p/Dig1p/Dig2p werden etwa 200 Paarungs-spezifische Gene transkriptionell induziert (Roberts *et al.*, 2000). Die Phosphorylierung von Far1p bewirkt das Anhalten des Zellzyklus. Dies geschieht vermutlich durch die Inhibition der Cyclin-abhängigen Kinase Cdc28p (Peter & Herskowitz, 1994). Die aktivierte MAP Kinase Fus3p ist allerdings nicht nur für das Anhalten des Zellzyklus und die Induktion von Paarungs-spezifischen Genen zuständig. Wie sich zeigte lokalisiert aktiviertes Fus3p in Gegenwart des Paarungs-Pheromons am apikalen zellulären Kortex von Hefezellen, welche sogenannte *Mating-projections*, auch „Shmoos“ genannt, ausbilden. Aktiviertes Fus3p ist in solchen Zellen eine Voraussetzung für die Ausbildung von Pheromon-induzierter Zell-Polarität (Matheos *et al.*, 2004, van Drogen *et al.*, 2001). Die regulatorische Wirkung auf die Zell-Polarität ist vermutlich in erster Linie dem Fus3p-Substrat Bni1p zuzuschreiben, welches im aktivierten Zustand die Bildung von

Aktin-Kabeln organisiert und auf diese Weise eine wesentliche Funktion bei der Polarisierung des Zytoskeletts übernimmt.

### **1.5 Der molekulare Adapter BEM-1 - von Zellpolarität über MAPK-Signaltransduktion zu reaktiven Sauerstoffspezies**

Der molekulare Adapter Bem1p fördert in *S. cerevisiae* sowohl das Entstehen von *Shmoos* während der Paarung als auch die Bildung von Knospen während der vegetativen Zellteilung (Chenevert *et al.*, 1992, Lyons *et al.*, 1996). Bem1p zählt zu der Gruppe von Proteinen, welche eine wesentliche Rolle bei der Ausbildung und Aufrechterhaltung von Zellpolarität übernehmen (Chant *et al.*, 1991, Chant & Herskowitz, 1991). Bei der Paarung von Zellen unterschiedlichen Paarungstyps unterstützt es die Zelle darin, ihre Polaritätsmaschinerie in einem Gradienten einer externen Signalsubstanz, dem Paarungs-Pheromon, auszurichten. Während der Knospung ist es daran beteiligt, die Zellpolaritätsmaschinerie an den Ort der neu entstehenden Knospe am zellulären Kortex zu dirigieren. Während Bem1p bei der Knospung zu festsitzenden internen Landmarken-Proteinen rekrutiert wird, sorgt während der Paarung der extern stimulierte Pheromonrezeptor mithilfe der Proteine Ste5p, Far1p und Cdc24p dafür, dass Bem1p lokal rekrutiert wird. Nach dem von Chenevert *et al.* postulierten Modell wird hierbei mithilfe von Bem1p das Programm zur Ausrichtung der Zellpolarität auf die Knospungs-spezifischen Landmarken-Proteine überschrieben und die Zellpolaritätsmaschinerie in Richtung aktivierten Pheromon-Rezeptor umgelenkt (Chenevert, 1994, Chenevert *et al.*, 1994).

Die ersten beschriebenen *S. cerevisiae* Mutanten, welche Träger eines defekten *bem-1* Allels waren, wurden in einer Kollektion von temperatur-sensitiven Mutanten entdeckt, die sich dadurch kennzeichneten, unter der restriktiven Temperatur zu überdurchschnittlich großen Zellen heranzuwachsen (Adams *et al.*, 1990). Nähere Untersuchungen zeigten, dass die *bem-1<sup>ts</sup>*-Zellen auch unter der permissiven Temperatur Defekte aufwiesen und zu großen, vielkernigen Zellen heranwuchsen, bevor sie eine neue Knospe ausbildeten (Bender & Pringle, 1991, Chant *et al.*, 1991). Wie sich später zeigte, hatte eine Deletion von *bem-1* ähnliche Auswirkungen (Chenevert *et al.*, 1992). Aus einer anderen Kollektion stammende Mutanten mit andersartigen *bem-1* Allelen zeigten im Gegensatz zu den *bem-1<sup>ts</sup>*-Mutanten keine

vegetativen Wachstumsdefekte, jedoch waren sie nicht mehr in der Lage als Antwort auf das Paarungs-Pheromon *Shmoos* auszubilden (Chenevert *et al.*, 1992, Chenevert *et al.*, 1994). Anstelle dessen wuchsen die Zellen der mit *bem1-s1* und *bem1-s2* bezeichneten Mutanten nach Zugabe von Paarungs-Pheromon lediglich zu großen, unpolarisierten Zellen heran. Spätere Untersuchungen der  $\Delta$ *bem-1* Mutante zeigten eine 60-fache Verringerung der Paarungs-Effizienz im Vergleich zum Wildtyp (Lyons *et al.*, 1996).

Das Bem1p-Protein von *S. cerevisiae* zeigt deutliche Homologien zu Proteinen in der Hefe *Schizosaccharomyces pombe* (Endo *et al.*, 2003), dem dimorphen Basidiomyceten *Ustilago maydis* (Alvarez-Tabares & Perez-Martin, 2008), den filamentösen Ascomyceten *Aspergillus nidulans* (Leeder & Turner, 2008) und *Epichloë festucae* (Takemoto *et al.*, 2011) sowie in anderen Pilz-Spezies (Kawahara & Lambeth, 2007). Die Bem1p-Homologe sind konservierte Pilz-spezifische Proteine, welche ausserhalb des Reichs der Pilze nicht vorhanden sind. Im Gegensatz dazu sind die drei konservierten Domänen der Bem1p-Proteine SH3-(*Src homology*), PB1- (*Phox and Bem1*) und PX-(*Phox*) jedoch universelle, hoch konservierte Motive, die in unterschiedlichsten Proteinen vieler Organismen zu finden sind (Sumimoto *et al.*, 2007, Kaneko *et al.*, 2008, Ellson *et al.*, 2002). Das Bem1p-Protein von *S. cerevisiae* besitzt zwei SH3-Domänen in der N-terminalen Hälfte sowie eine PX- und eine PB1-Domäne im C-terminalen Teil (Bose *et al.*, 2001, Irazoqui *et al.*, 2003, Ito *et al.*, 2001, Slaughter *et al.*, 2009). Die zweite SH3-Domäne, welche weiter C-terminal positioniert ist, wird fortan als SH3b-Domäne bezeichnet, um sie von der N-terminalen SH3a-Domäne zu unterscheiden. SH3-Domänen sind Protein-Protein-Interaktionsdomänen. Bem1p bindet mithilfe seiner SH3b-Domäne an folgenden Interaktionspartner: Cdc42p, Cla4p, Ste20p sowie Boi1p und Boi2p (Bose *et al.*, 2001, Butty *et al.*, 1998, Gulli *et al.*, 2000, Ito *et al.*, 2001, Slaughter *et al.*, 2009, Yamaguchi *et al.*, 2007). Über die PB1-Domäne bindet Bem1p an Cdc24p (Ito *et al.*, 2001). Darüber hinaus wurden Ste5p und Aktin als Bem1p-Interaktionspartner identifiziert (Leeuw *et al.*, 1995). Allerdings wurden bisher für beide Proteine noch keine spezifischen Bindedomänen definiert. Mithilfe der PX-Domäne bindet Bem1p möglicherweise an Phosphoinositide, welche die Funktion haben könnten das Protein mit der Membran zu assoziieren (Stahelin *et al.*, 2007). Denkbar ist auch eine Assoziation mit Phosphatidylserin, welches in *S. cerevisiae* während Knospung und Paarung stark

polarisiert und für die korrekte Lokalisierung des Zellpolaritäts-Regulators Cdc42p essentiell ist (Fairn *et al.*, 2011, Freisinger & Wedlich-Soldner, 2011).

### **1.5.1 Bem1p und seine Funktion in Knospung, Symmetrie-Brechen und Paarung in *S. cerevisiae***

Obwohl die Funktion von Bem1p während Knospung und Paarung in *S. cerevisiae* noch nicht vollständig verstanden ist, gibt es mittlerweile für beide Prozesse recht detaillierte Arbeitsmodelle. Im folgenden Kapitel wird das der Hefe-Knospung zugrunde liegende Modell näher erläutert, wobei vor allem mechanistische Aspekte der Ausbildung und Aufrechterhaltung von Zellpolarität hervorgehoben werden. Der Signalweg der Paarungs-Pheromon-Antwort wurde bereits in Kapitel 1.4 behandelt. Die Rolle von Bem1p in diesem Signaltransduktionsweg wird abschließend detaillierter erläutert.

#### *1.5.1.1 Bem1p während Knospung und Symmetrie-Brechen*

Knospung ist eine Art asymmetrische Zellteilung, bei welcher die Knospe wächst, aber die Mutterzelle nicht. Bevor sich eine Knospe bildet, wird die Hefezelle stark polarisiert, um selektives Wachstum der Knospe zu gewährleisten (Pruyne & Bretscher, 2000). Während des Lebenszyklus von *S. cerevisiae* polarisieren die Zellen beim Übergang von der G1- zu S-Phase, um das zelluläre Wachstum so zu orientieren, dass die Bildung einer Knospe ermöglicht wird. In der frühen G1-Phase sind die Zellen von *S. cerevisiae* noch rund und wachsen zunächst isotrop. Das Aktin-Zytoskelett ist depolarisiert und die kleine Rho-GTPase Cdc42p ist gleichmäßig über die gesamte Plasmamembran verteilt (Slaughter *et al.*, 2009). In Abwesenheit von Paarungs-Pheromon reichert sich gegen Ende der G1-Phase ein aktivierter Komplex bestehend aus der Cdk (*cyclin dependent kinase*) Cdc28p und G<sub>1</sub>-Zyklin (Lew & Reed, 1995) an. Dieser phosphoryliert das im Zellkern befindliche Adapter-Protein Far1p, welches daraufhin degradiert wird und den GEF Cdc24p aus dem Kern entlässt (Shimada *et al.*, 2000). Die parallel aktivierte Ras-GTPase Rsr1p, auch als Bud1p bezeichnet, interagiert mit so genannten Landmarken-Proteinen (*landmarks*), welche die Stelle der sich bildenden Knospe markieren (Bender & Pringle, 1989, Chant & Herskowitz, 1991). Aktiviertes Rsr1p-GTP rekrutiert Cdc24p, welches bei Cdc42p

einen Austausch von GDP zu GTP bewirkt (Park *et al.*, 1997, Park *et al.*, 2002, Chant & Stowers, 1995). Cdc42p gilt als eine der Hauptkomponenten der Zellpolaritätsmaschinerie, da es im GTP-gebundenen Zustand durch die Aktivierung zahlreicher Effektoren auf mehreren Wegen die Polarisierung des Zytoskeletts und des sekretorischen Apparats bewirkt (Park & Bi, 2007). Daher ist die Etablierung eines stabilen Clusters von Cdc42p-GTP am zellulären Kortex ein entscheidender Schritt für die Ausbildung und Aufrechterhaltung von Zellpolarität. Zwei wesentliche Cdc42p-Effektoren, welche direkt mit dem Aktin-Zytoskelett interagieren, sind die p21-aktivierte Kinase (PAK) Cla4p und das Formin Bni1p (Cvrckova *et al.*, 1995, Evangelista *et al.*, 1997, Johnson, 1999). Nach dem gängigen Modell spielt das Adapter-Protein Bem1p eine wesentliche Rolle bei der Verstärkung von Cdc42p-GTP-Clustern (Butty *et al.*, 2002, Irazoqui *et al.*, 2003, Wedlich-Soldner *et al.*, 2004). Entscheidene Erkenntnisse über die molekulare Funktion von Bem1p wurden im Zusammenhang mit der Erforschung des *Symmetry Breaking* - Phänomens erbracht, welches nachfolgend erläutert wird (Atkins *et al.*, 2008, Irazoqui *et al.*, 2003, Kozubowski *et al.*, 2008, Wedlich-Soldner *et al.*, 2004).

Sowohl haploide als auch diploide Hefezellen bilden ihre Knospen nach einem streng kontrollierten Muster (Casamayor & Snyder, 2002, Chant, 1994). Haploide Zellen bilden ihre Knospen jeweils in nächster Nähe zur Knospen-Narbe der vorangegangenen Knospung aus (axiale Knospung) während diploide Zellen diese jeweils wechselweise am Pol der letzten Knospung bzw. am gegenüberliegenden Pol ausbilden (bipolare Knospung). In beiden Fällen spielt Rsr1p dabei eine Schlüsselrolle, indem es die räumliche Information der Landmarken-Proteine an die Zellpolaritätsmaschinerie weiterleitet (Park *et al.*, 2002). Zellen, in denen *rsr1* deletiert ist, haben keine Möglichkeit die räumliche Information der Landmarken-Proteine an die Zellpolaritätsmaschinerie zu übersetzen. Ihre Knospen bilden sie an zufälligen Stellen des Kortex aus, jedoch mit der gleichen Effizienz wie Wildtyp-Zellen (Chant & Herskowitz, 1991).  $\Delta$ *rsr1*-Zellen sind demnach „blind“ gegenüber ihrer erblich vorgegebenen Zellasymmetrie. Bilden Zellen wie die der  $\Delta$ *rsr1*-Mutante unabhängig von intra- oder extrazellulärer räumlicher Information an ihrem Kortex ein stabiles Cdc42p-Cluster, so bezeichnet man diesen Prozess als Symmetrie-Brechen (*symmetry breaking*) (Wedlich-Soldner & Li, 2003). Die diesem Phänomen zugrunde liegenden sich selbst organisierenden Mechanismen sind bis heute

Gegenstand intensiver Forschung, welche bereits in hohem Maße unser Verständnis über die Ausbildung und Aufrechterhaltung von Zellpolarität gefördert hat. Das Symmetrie-Brechen durch die Bildung eines Cdc42p-Clusters ist auch in Abwesenheit von Aktin-Filamenten und Mikrotubuli möglich (Irazoqui *et al.*, 2003). Ein intaktes Cdc42p, welches in der Lage ist GTP zu hydrolysieren, muss jedoch zur Verfügung stehen (Irazoqui *et al.*, 2003, Wedlich-Soldner *et al.*, 2004). Eine weitere wesentliche Voraussetzung ist das Vorhandensein von Bem1p (Irazoqui *et al.*, 2003). Zellen, in denen sowohl *rsr1* als auch *bem1* deletiert wurden, sind synthetisch lethal. Demnach ist Bem1p ein für das Symmetrie-Brechen essentieller Faktor. Die Rolle von Bem1p im Symmetrie-Brechen ist noch nicht vollständig geklärt. Nach einem Modell von Butty *et al.* verstärkt Bem1p die Aktivität von zufällig fluktuierenden Cdc42p-Clustern am zellulären Kortex, indem es an Cdc42p-GTP bindet und durch die gleichzeitige Rekrutierung von Cdc24p lokal die Umwandlung von Cdc42-GDP in Cdc42-GTP fördert (Butty *et al.*, 2002). Spätere Untersuchungen zeigten, dass für die Etablierung eines solchen positiven Rückkopplungs-Mechanismus nicht die Bindung von Bem1p an Cdc42p-GTP entscheidend ist, sondern die Interaktion zwischen Bem1p und der PAK Cla4p (Atkins *et al.*, 2008, Kozubowski *et al.*, 2008). Cla4p bindet mithilfe seiner CRIB-Domäne (*Cdc and Rac interaction binding*) an Cdc42p-GTP und wird auf diese Weise aktiviert (Cvrckova *et al.*, 1995, Johnson, 1999). Zusätzlich zur direkten Bindung von Bem1p an Cdc42p-GFP bewirkt diese Interaktion ebenso eine Rekrutierung von Bem1p zum Polaritäts-Cluster (Atkins *et al.*, 2008, Kozubowski *et al.*, 2008). Darüber hinaus führt der ternäre Cla4p-Bem1p-Cdc24p Komplex dazu, dass Cdc24p durch Cla4p phosphoryliert wird, was vermutlich eine Erhöhung der GEF-Aktivität zur Folge hat (Atkins *et al.*, 2008, Bose *et al.*, 2001, Kozubowski *et al.*, 2008). Allerdings wird nicht nur die Adapter-Funktion von Bem1p in Betracht gezogen, die Aktivität von Cdc24p zu steigern (Shimada *et al.*, 2004). Vermutlich wird allein durch die Bindung von Bem1p an Cdc24p ein autoinhibitorischer Effekt des GEFs aufgehoben, was dazu führt, dass Cdc24p in seiner aktiven Form stabilisiert wird. Festzuhalten sei an dieser Stelle, dass Bem1p durch die Rekrutierung von Cdc24p zu GTP-gebundenem Cdc42p an der Generierung eines positiven Rückkopplungs-Mechanismus beteiligt ist, welcher die Ausbildung eines stabilen Polaritäts-Clusters fördert. Unabhängig von diesem Rückkopplungs-Mechanismus konnte gezeigt werden, dass an der Amplifizierung von Cdc42p-Clustern zusätzlich ein Zytoskelett-basierter Weg beteiligt ist (Wedlich-Soldner *et al.*, 2003, Wedlich-

Soldner *et al.*, 2004). Das sich daraus ergebende Modell geht davon aus, dass membranständiges Cdc42p endozytotisch recycelt wird, sobald es in die Randbereiche des Clusters diffundiert (Marco *et al.*, 2007, Wedlich-Soldner *et al.*, 2004). Basierend auf einem polarisierten Aktin-Zytoskelett wird das in Vesikeln gebundene Cdc42p über den sekretorischen Weg wieder dem Zentrum des Clusters zugeführt. Hieraus ergibt sich demzufolge ein Bem1p-unabhängiger positiver Rückkopplungs-Mechanismus: das im Polaritäts-Cluster akkumulierte Cdc42p-GTP rekrutiert Aktin-Filamente, welche ihrerseits das Cluster mit Cdc42p versorgen und somit den Grad der Polarisierung verstärken. Zwei wesentliche Dinge müssen für eine effiziente Knospung gewährleistet sein. Zum einen sollte das Zellwachstum in der Ausbildung von genau einer Knospe münden, zum anderen sollte die Polaritätsachse möglichst stabil sein und wenig ihre räumliche Orientierung verändern. Vieles deutet darauf hin, dass Hefezellen beides erreichen, indem sie zwei unterschiedliche positive Rückkopplungs-Mechanismus zur Ausbildung und Aufrechterhaltung von Zellpolarität miteinander kombinieren (Goryachev & Pokhilko, 2008, Houk *et al.*, 2009, Howell *et al.*, 2009, Marco *et al.*, 2007, Wedlich-Soldner *et al.*, 2003, Wedlich-Soldner *et al.*, 2004, Brandman *et al.*, 2005). Zum einen ergibt sich durch die Konkurrenz um einen limitierenden Vorrat des schnell diffundierenden Signalmoleküls Bem1p eine Situation, in der das gewinnende Cluster alles bekommt und dadurch andere Cluster aussticht, was wiederum dazu führt, dass sich nur eine einzige Knospe ausbildet. Zum anderen wird das Cluster mithilfe des weniger dynamischen Zytoskeletts positiv verstärkt und dadurch räumlich fixiert. Für dieses Modell spricht, dass sich in den Untersuchungen von Wedlich-Soldner *et al.*  $\Delta bem-1$  Zellen zeigten, die zwei Polaritäts-Cluster ausbildeten, während dies in der Wildtyp-Population niemals der Fall war. Demgegenüber bildeten sich in Wildtyp-Zellen mit depolymerisiertem Aktin-Zytoskelett driftende Polaritäts-Cluster, welche im zeitlichen Verlauf einen unstetigen Polarisierungsgrad erkennen ließen (Wedlich-Soldner *et al.*, 2004). Howell *et al.* lieferten mit weiterführenden Experimenten zusätzliche Unterstützung. Durch die Fusion von Bem1p mit dem v-SNARE Snc2p gelang es ihnen den lethalen Effekt einer Mutante zu komplementieren, bei welcher gleichzeitig *bem1* und *rsr1* deletiert waren (Houk *et al.*, 2009, Howell *et al.*, 2009). Auf diese Weise zwangen sie Bem1p über den Aktin-basierten sekretorischen Weg zu wirken. Anstelle eines schnell diffundierenden Bem1p stand der Zelle demnach nur ein in der Plasmamembran und in Vesikeln verankertes Bem1p zur Verfügung. Die



derart „neu-verdrahteten“ Hefezellen bildeten mit einer deutlichen Verzögerung mehrere Polaritäts-Cluster aus, was die Entstehung von mehreren Knospen zur Folge hatte. Das Zusammenwirken von Bem1p-abhängigen und Aktin-abhängigen Rückkopplungs-Mechanismen ist demnach eine Voraussetzung für die Ausbildung eines einzigen Polaritäts-Clusters, sowie für das Erreichen einer robusten zeitlichen und räumlichen Stabilität.

#### 1.5.1.2 Bem1p und seine Rolle in der Signaltransduktion der Pheromon-Antwort

Das Adapter-Protein Bem1p spielt eine tragende Rolle als Signalverstärker zur Ausbildung von Zellpolarität am aktivierten Pheromonrezeptor (Leeuw *et al.*, 1995, Lyons *et al.*, 1996, Moskow *et al.*, 2000). Diese Signalverstärkung verläuft vermutlich über einen Mechanismus, welcher zu dem der Knospung ähnlich ist und durch die gleichzeitige Bindung an den GEF Cdc24p und die PAK Ste20p eine positive Rückkopplung erzeugt, welche eine Aktivitätserhöhung von Cdc24p, Cdc42p und Ste20p bewirkt (Atkins *et al.*, 2008, Kozubowski *et al.*, 2008) (vgl. EL, Abschnitt 1.5.1.1). Darüber hinaus erfüllt Bem1p durch Bindung an das Gerüst-Protein Ste5p eine weitere wesentliche Funktion (Moskow *et al.*, 2000). Auf diese Weise verknüpft es Hauptkomponenten der Zellpolaritäts-Maschinerie wie das Cdc42p-Modul mit dem MAPK-Signaltransduktions-Weg. Indem Bem1p hierbei die aktivierte PAK Ste20p in die Nähe der MAPKKK Ste11p rekrutiert, fördert es die Stimulation des MAPK-Moduls. Hinsichtlich der Keimlingsfusion in *N. crassa* stellt sich die Frage, ob BEM-1 hier möglicherweise auf ähnliche Weise zwischen Komponenten der Zellpolaritätsmaschinerie und der MAPK-Signaltransduktion vermittelt. *N. crassa* besitzt im Gegensatz zu *S. cerevisiae* weder ein Ste5p- noch ein Far1p-Homolog. Daher bedarf es der Klärung, ob es möglicherweise Proteine gibt, die die Funktionen von Ste5p und Far1p in *N. crassa* übernehmen.

### 1.5.2 BEM-1 - ein Regulator von NADPH-Oxidasen?

Über die Möglichkeit, dass BEM-1 in filamentösen Pilzen zusammen mit der kleinen Rho-GTPase RAC-1 und dem NOXR-Protein die Aktivität von NADPH-Oxidase-Komplexen reguliert, wird derzeit verstärkt diskutiert (Aguirre & Lambeth, 2010, Kawahara & Lambeth, 2007, Scott & Eaton, 2008, Semighini & Harris, 2008, Takemoto *et al.*, 2011). Eine attraktive Hypothese ist derzeit, dass BEM-1 eine analoge Funktion zu der in Tieren vorkommenden regulatorischen Untereinheit p40phox des phagozytotischen NADPH-Oxidase-Multiproteinkomplexes übernimmt (Kawahara & Lambeth, 2007, Scott & Eaton, 2008). NADPH-Oxidasen sind membranständige Enzyme, welche NADPH oxidieren und dabei ein Elektron auf molekularen Sauerstoff übertragen (Bedard & Krause, 2007). Das hierbei entstehende Produkt ist das reaktive Superoxidradikal  $O_2^{\cdot-}$ , welches zu den reaktiven Sauerstoffspezies, kurz „ROS“ (*reactive oxygen species*), gezählt wird (Babior *et al.*, 1973). In lebenden Organismen weist es eine geringe Halbwertszeit auf, da es sowohl spontan als auch in Anwesenheit von Superoxid-Dismutase zur reaktiven Sauerstoffspezies  $H_2O_2$  dismutiert (Aguirre & Lambeth, 2010).

Grundsätzlich kommen NADPH-Oxidasen in allen vielzelligen Eukaryoten vor, nicht aber in einzelligen Hefen (Aguirre *et al.*, 2005, Lara-Ortiz *et al.*, 2003, Lalucque & Silar, 2003). Sie stehen in Verbindung mit einer großen Anzahl zellulärer Differenzierungsprozesse, welche besonders für vielzellige Organismen von Bedeutung sind (Lalucque & Silar, 2003). In Säugetieren spielen NADPH-Oxidasen unter anderem eine Rolle bei der Entwicklung von kardialen Vorläuferzellen zu spontan schlagenden Kardiomyozyten (Li *et al.*, 2006). Zuerst entdeckt wurden NADPH-Oxidasen jedoch in Phagozyten von Säugetieren (Royer-Pokora *et al.*, 1986, Teahan *et al.*, 1987). Indem sie einen gezielten *oxidative burst* auslösen, beteiligen sie sich an der Tötung der in den Phagosomen eingeschlossenen Pathogene. Die phagozytische NADPH-Oxidase ist ein mittlerweile detailliert beschriebener Multiproteinkomplex, bestehend aus den Untereinheiten NOX-2/gp91phox, p22phox, p67phox (NOXR), p47phox und p40phox (Bedard & Krause, 2007). Das Suffix „phox“ steht hierbei für *phagocytic oxidase*. Die katalytische Untereinheit ist NOX-2/gp91phox, p22phox ist ein essentieller Stabilisator (Dinauer *et al.*, 1990) und p67phox ist für die Aktivierung des Komplexes zuständig (Nisimoto *et al.*, 1999). Zudem ist die kleine GTPase RAC-1 ebenfalls eine unentbehrliche Komponente für die

Aktivierung von NOX-2/gp91phox (Diebold & Bokoch, 2001). CDC-42 hat hingegen einen gegenteiligen Effekt und bewirkt eine Inaktivierung des Komplexes (Diebold *et al.*, 2004). Die Untereinheiten p47phox und p40phox sorgen für die Rekrutierung des Aktivators p67phox an die Plasmamembran bzw. an die Membran früher Endosomen (Ueyama *et al.*, 2007).

Wie in allen anderen eukaryotischen Vielzellern spielen ROS auch in filamentösen Pilzen eine wesentliche Rolle in diversen zellulären Differenzierungsprozessen (Aguirre & Lambeth, 2010). Phylogenetische Analysen zeigten, dass filamentöse Pilze bis zu drei NADPH-Oxidase Gene (*noxA* - *noxC*) aufweisen (Aguirre *et al.*, 2005, Lara-Ortiz *et al.*, 2003). Während *noxR* als *p67phox*-Homolog identifiziert wurde, konnten für die anderen Komponenten der phagozytischen NADPH-Oxidase keine klaren Homologe gefunden werden (Takemoto *et al.*, 2006). Die Untereinheit p40phox besitzt eine SH3-, eine PX- und eine PB1- Domäne und weist daher strukturelle Ähnlichkeiten mit dem Adapter-Protein BEM-1 auf (Kawahara & Lambeth, 2007). Erste empirische Hinweise, dass BEM-1 in filamentösen Pilzen Einfluss auf die lokale Aktivierung von NADPH-Oxidasen hat, ergeben sich daraus, dass in einer  $\Delta bema$ -Mutante ( $\Delta bema-1$ ) von *Epichloë festucae* die Komplexbildung von NoxR (p67phox) an der Zellspitze gestört ist (Takemoto *et al.*, 2011).

*N. crassa* weist zwei NADPH-Oxidasen auf (NOX-1 und NOX-2) (Cano-Dominguez *et al.*, 2008). Eine  $\Delta nox-1$  Mutante erwies sich als weiblich steril und zeigte sowohl Defekte in der asexuellen Entwicklung als auch im Hyphenwachstum. Eine *nox-2* Deletion war hingegen in keinem dieser Prozesse gestört, führte jedoch zur Produktion von Ascosporen, welche nicht in der Lage waren zu keimen. Die Deletion von *nor-1* (p67phox) führte zu Defekten, welche die Phänotypen von  $\Delta nox-1$  und  $\Delta nox-2$  gleichermaßen widerspiegeln (Cano-Dominguez *et al.*, 2008). Diese Tatsache deutet darauf hin, dass NOR-1 sowohl für die Aktivierung von NOX-1 als auch für die von NOX-2 verantwortlich ist. Basierend auf den bisherigen Daten aus filamentösen Pilzen und einzelligen Hefen erscheint BEM-1 als ein vielversprechender Kandidat, welcher möglicherweise in filamentösen Pilzen die Modulation von ROS- und MAPK-Signaltransduktionswegen mit der Regulation von Zellpolarität vereint. Bezüglich der Untersuchung dessen sei an dieser Stelle die Bedeutung filamentöser Pilze als Modellorganismen im Vergleich zu einzelligen Hefen hervorgehoben, welche keine NADPH-Oxidase-Komplexe aufweisen.

## 1.6 Zielsetzung

Die Fusion von autonomen zellulären Einheiten ist ein Prozess, welcher für Fortpflanzung und Entwicklung vielzelliger Eukaryoten essentiell ist. Der gut charakterisierte Modellorganismus *N. crassa* bietet aufgrund seiner einfachen Handhabung im Labor, seines auf diversen Zellfusions-Ereignissen beruhenden Lebenszyklus sowie seiner vorteilhaften Eigenschaften für die *live-cell* - Mikroskopie ein hervorragendes Modell zur Untersuchung eukaryotischer Zell-Fusion. Speziell die Entdeckung der schnell oszillierenden Plasmamembran-Rekrutierung der Proteine MAK-2 und SO in fusionierenden *N. crassa* - Keimlingen eröffnete neue Möglichkeiten zur Untersuchung eines bisher einzigartigen intrazellulären Signalmechanismus in genetisch identischen Individuen (Fleissner *et al.*, 2009b).

Das Signalprotein BEM-1 ist ein möglicher Kandidat, welcher in *N. crassa* eine wesentliche Funktion bei Zellfusions-Prozessen übernehmen könnte. Das in *S. cerevisiae* mittlerweile recht gut charakterisierte Homolog Bem1p spielt eine entscheidende Rolle bei der Ausbildung und Ausrichtung von Zellpolarität und stellt ein Bindeglied zwischen der Zellpolaritätsmaschinerie und MAP Kinase-basierter Signaltransduktion dar. Ausbildung und Ausrichtung von Zellpolarität sind Voraussetzungen für jegliche Art von Zell-Fusion. Ziel dieser Arbeit ist es, die Funktion von BEM-1 hinsichtlich vegetativer und sexueller Zell-Fusion mit Hilfe einer Kombination aus klassischer und molekularer Genetik, biochemischer Charakterisierung, *live-cell*-Fluoreszenz-Mikroskopie sowie *fluorescence recovery after photobleaching* (FRAP) zu untersuchen. Besondere Aufmerksamkeit gilt den Aspekten gerichtetes Wachstum sowie Zell- und Plasmamembran-Fusion. Darüber hinaus soll der Einfluss von BEM-1 auf die Regulation von fusionsunabhängiger Zellpolarität in *N. crassa* untersucht werden.

Von fundamentaler Bedeutung wird die Etablierung der hochauflösenden Deconvolutions-Mikroskopie im fluoreszierenden Weitfeld sein, welche bisher am Institut für Genetik in Braunschweig nicht angewendet wird. Mithilfe dieser Technologie soll es möglich sein, subzelluläre Lokalisierungen, Dynamiken und Kolokalisierungen von fluoreszenzmarkierten Proteinen in *N. crassa* auf hohem Niveau zu analysieren. Auf diese Weise sollen wesentliche Erkenntnisse über die Funktion von BEM-1 gewonnen werden und ein möglicher Zusammenhang mit den

oszillierenden Komponenten MAK-2 und SO untersucht werden. Die geplanten Untersuchungen werden mit dem Ziel in Angriff genommen, das Verständnis hinsichtlich der molekularen Mechanismen eukaryotischer Zell-Fusion zu fördern. Insbesondere stehen solche Mechanismen im Zentrum des Interesses, welche während der Zell-Zell-Kommunikation mittels Regulation von subzellulärer Lokalisationskinetik von Signalmolekülen die Spezifität und Intensität der Signaltransduktion modulieren.

# Material und Methoden

## 2.1 Chemikalien, Puffer und Lösungen

Tabelle 2.1: Chemikalien

Chemikalie	Anbieter
Agar	Roth
Acylamid	Roth
Agarose	Sigma
APS 10%	Roth
Bradford-Reagenz	Roth
Bromphenol-Blau	Serva
BSA	Roth
EDTA	Roth
EGTA	Roth
Fruktose	Fluka
Glukose Monohydrat	Roth
Glycin	Applichem
Hefeextrakt	BD
HEPES	Roth
Hygromycin	Invitrogen
Isopropanol	Roth
Methan	VWR
NaCl	Roth
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Roth
NaOH	Roth
Natriumacetat	Roth
Natriumfluorid	Merck
Natriumorthovanadat	Sigma
Phenol/Chloroform	Roth
Phosphinotricin	Duchefa
Saccharose	Roth
SDS	Roth

**Tabelle 2.1: Chemikalien - Fortsetzung**

SDS	Roth
Sorbose	Calbiochem
TEMED	SERVA
$\beta$ -Mercaptoethanol	Merck

**Tabelle 2.2: Puffer und Lösungen**

Zusammensetzung pro L		
20x BDES	200 g	Sorbose
	10 g	Sucrose
	10 g	Fructose
	ad 1 L	Wasser
		autoklavieren
Biotin-Stocklösung	50 mg	Biotin
	0,5 L	Wasser (v/v)
	0,5 L	Ethanol (v/v)
		steril filtrieren
Blockierungs-Lösung	5 %	Milchpulver
		in 1x TTBS
Denhardt's	1 %	BSA
	1 %	Ficoll 400
	1 %	Polyvinylpyrrolidon
10x FIGS	200 g	L-Sorbose
	5 g	D-Fructose
	5 g	D-Glucose
	ad 1 L	Wasser
		steril filtrieren
Hybridisierungslösung	5 x	SSPE
Southern	5 x	Denhardt's
	0,5 %	SDS
	10 $\mu$ g/mL	Lachssperma-DNA (Applichem)
	7,5 %	Dextransulfat

**Tabelle 2.2: Puffer und Lösungen - Fortsetzung**

5x Laufpuffer für Proteingele	15,2	g	Tris
	72,0	g	Glycin
	5,0	g	SDS
	ad 1	L	Wasser
Lsg. I	50	mM	Glukose
	25	mM	Tris pH 8
	10	mM	EDTA
Lsg. II	0,2	M	NaOH
	1	%	SDS
Lsg. III	300	mL	5 M Kaliumacetat
	57,5	mL	Eisessig
	142,5	mL	Wasser
Lysispuffer (DNA-Extraktion)	50	mM	Tris HCl pH 7,5
	50	mM	EDTA
	30	g	SDS
	ad 1	L	Wasser
			autoklavieren
	10	µL/mL	β-Mercaptoethanol (vor Gebrauch)
2x Probenpuffer für Proteine	6	%	SDS
	0,6	%	Bromphenolblau
	20	%	Glycerin
	150	µL/mL	β-Mercaptoethanol (vor Gebrauch)
Proteinextraktionspuffer	50	mM	HEPES pH 7,5
	5	mM	EDTA pH 8
	2	mM	EGTA pH 8
	100	mM	NaCl
	1	%	Triton
	10	%	Glycerin
	1	mM	Natriumorthovanadat
	10	mM	Natriumfluorid
	1	Tab	„Roche complete“ (Protease-Inhibitor) á 20 ml



Tabelle 2.2: Puffer und Lösungen - Fortsetzung

SEVAG	24:	1	Chloroform:Isoamylalkohol
Sorbitol	182,2	g	Sorbitol
	ad 1	L	Wasser
			autoklavieren
Spurenelement- Stocklösung	50	g	Zitronensäure x H <sub>2</sub> O
	50	g	ZnSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O
	10	g	Fe(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) x 6 H <sub>2</sub> O
	2,5	g	CuSO <sub>4</sub> x 5 H <sub>2</sub> O
	0,5	g	MnSO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O
	0,5	g	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>
	0,5	g	NaMoO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O
	ad 1	L	Wasser
			steril filtrieren
20x SSPE	3	M	NaCl
	200	mM	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	20	mM	EDTA
	10	M	NaOH
			pH 7,4
			autoklavieren
2x SSPE-Waschpuffer	20 x		SSPE
	5	mL	10% SDS
	445	mL	Wasser
50x TAE	242	g	Tris
	57,1	mL	Eisessig
	100	mL	0,5 M EDTA pH 8,8
	843	mL	Wasser
10x TBS	200	mM	Tris HCl pH 7,5
	1,5	M	NaCl
TE	10	mM	Tris HCl pH 8,0
	0,1	mM	EDTA
1x TTBS	0,1	%	Tween 20 in 1x TBS

**Tabelle 2.2: Puffer und Lösungen - Fortsetzung**

50x Vogel's Lösung	755	mL	Wasser
	125	g	Na <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub> x 2 H <sub>2</sub> O
	250	g	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	100	g	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>
	10	g	MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O
	5	g	CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O
	5	mL	Spurenelement-Stocklösung
	2,5	mL	Biotin-Stocklösung
	5	mL	Chloroform
Westergaard's Lösung	2	g	KNO <sub>3</sub>
	1,4	g	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	1	g	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	1	g	MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O
	0,2	g	NaCl
	0,2	g	CaCl <sub>2</sub>
	0,1	mL	Biotin-Stocklösung
	0,2	mL	Spurenelement-Stocklösung
	ad 1	L	Wasser
1x Western	25	mM	Tris
Transferpuffer	192	mM	Glycin
	20	%	Methanol

## 2.2 *N. crassa* Stämme und Anzuchtbedingungen

Die *N. crassa* Stämme, welche in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden, sind in Tabelle 2.4 aufgelistet. Die Plasmide, welche für die Herstellung dieser Stämme verwendet wurden sind in Tabelle 2.5 aufgelistet. In dieser Liste finden sich Kurzbeschreibungen zur jeweiligen Klonierungs-Strategie. Weitere Details sind dem entsprechenden Abschnitt des Ergebnisteils zu entnehmen. *N. crassa* Stämme wurden auf Vogel's Minimal-Medium (Vogel, 1956) angezogen. Für Stämme mit auxotrophen Markern wurden die entsprechenden Supplemente beigelegt. Kreuzungen wurden auf Westergaards-Medium durchgeführt (Westergaard, 1947) (vgl. M&M, 2.4). Zur

Analyse des Paarungstyps (Mat a oder Mat A) wurden die entsprechenden Stämme mit den Tester-Stämmen fl a (FGSC 4347) and fl A (FGSC 4317) gekreuzt.

**Tabelle 2.3: Kulturmedien**

Medium	Zusammensetzung pro L		
BDES	20	mL	50x Vogel's Lösung
	15	mg	Agar
	0,95	L	Wasser autoklavieren
	50	mL	20x BDES
	500	mg/L	Histidin
	200	mg/L	Hygromycin
Bottom-Agar	20	mL	50x Vogel's solution
	15	g	Agar
	0,9	L	Wasser autoklavieren
	100	mL	10x FIGS
	200	mg/L	Hygromycin
"Corn Meal"	17	g/L	BBL™ Corn Meal Agar (BD)
	1	g/L	Glucose
Minimal-Medium	20	mL	50x Vogel's Lösung
	20	g	Sucrose
	15/20	g	Agar
	0,98	L	Wasser autoklavieren
	500	mg/L	Histidin
	200	mg/L	Hygromycin
Natriumacetat-Medium	20	mL	50x Vogel's Lösung
	12	g	Natriumacetat
	15	g	Agar
	0,98	L	Wasser autoklavieren

Tabelle 2.3: Kulturmedien - Fortsetzung

Top-Agar	20 g	50x Vogel's Lösung
	10 g	Agar
	0,9 L	Wasser
		autoklavieren
	100 mL/L	FIGS
Wasser-Agar	20 g	Bacto-Agar (Difco)
	1 L	Wasser
Westergaard's	500 mL	2x Westergaard's Lösung
	15 g	Saccharose
Medium	15 g	Agar
	0,5 L	Wasser
		autoklavieren

Tabelle 2.4: *N. crassa*-Sämme

Stamm	Genotyp	Vektor	Empfänger-stamm	Eltern-stämme	Herkunft
N1-01	A	-	-	-	FGSC 2489
N1-02	a	-	-	-	FGSC 988
N1-03	<i>his3; A</i>	-	-	-	FGSC 6103
N1-06	$\Delta$ <i>mus52::bar+; a</i>	-	-	-	FGSC 9719
21-A1	$\Delta$ <i>bem1::hph; \Delta</i> <i>mus52::bar+; a</i>	Deletionskassette	FGSC 9719	-	diese Arbeit
N1-05	$\Delta$ <i>mus52::bar+; his3; A</i>	-	-	-	FGSC 9720
2-A1	$\Delta$ <i>bem1::hph; \Delta</i> <i>mus52::bar+; his3; A</i>	Deletionskassette	FGSC 9720	-	diese Arbeit
2208	$\Delta$ <i>bem1::hph; his3+::Pccg1-bem1-gfp; \Delta</i> <i>mus52::bar+; A</i>	-	-	21-A1 x N3-335-A1	Diese Arbeit
N1-41	<i>his3+::Pccg1-mak2-gfp; A</i>	s. Referenz	s. Referenz	-	Fleissner <i>et al.</i> 2009
2-MG	$\Delta$ <i>bem1::hph; his3+::Pccg1-mak2-gfp; \Delta</i> <i>mus52::bar; A</i>	pMH-5.1	2-A1	-	diese Arbeit
AF-SoT8	<i>his3+::Pccg1-so-gfp; A</i>	s. Referenz	s. Referenz	-	Fleissner <i>et al.</i> 2007
2-SG	$\Delta$ <i>bem1::hph; his3+::Pccg1-so-gfp; \Delta</i> <i>mus52::bar; A</i>	pSO-8	2-A1	-	diese Arbeit
$\Delta$ PB1	$\Delta$ <i>bem1::hph; his3+::Pccg1-bem1\Delta</i> PB1; $\Delta$ <i>mus52::bar; A</i>	pbem1-ST-dPB1-8	2-A1	-	Diese Arbeit
$\Delta$ PX	$\Delta$ <i>bem1::hph; his3+::Pccg1-bem1\Delta</i> PX; $\Delta$ <i>mus52::bar; A</i>	pbem1-dPX-ST2	2-A1	-	Diese Arbeit
$\Delta$ PX-G	$\Delta$ <i>bem1::hph; his3+::Pccg1-bem1\Delta</i> PX- <i>gfp; \Delta</i> <i>mus52::bar; A</i>	pbem1-dPX-gfp-ST3	2-A1	-	Diese Arbeit

Tabelle 2.4: *N. crassa*-Sämme - Fortsetzung

ΔSH3a	<i>Δbem1::hph; his3+::Pccg1-bem1ΔSH3a; Δmus52::bar; A</i>	pbem1-dSH3a-2	2-A1	-	Diese Arbeit
ΔSH3b	<i>Δbem1::hph; his3+::Pccg1-bem1ΔSH3b; Δmus52::bar; A</i>	pbem1-dSH3b-2	2-A1	-	Diese Arbeit
ΔSH3ab	<i>Δbem1::hph; his3+::Pccg1-bem1ΔSH3ab; Δmus52::bar; A</i>	pbem1-dSH3ab-1	2-A1	-	Diese Arbeit
2-BG	<i>Δbem1::hph; his3+::Pbem1-bem1-gfp; Δmus52::bar; A</i>	pbem1-bem1-gfp-5	2-A1	-	Diese Arbeit
N3-335-A1	<i>his3+::Pccg1-bem1-gfp; A</i>	pST-bem1-gfp-6	FGSC 6103	-	Diese Arbeit
WT-HG	<i>his3+::Pccg1-h1-gfp; Δmus52::bar+; A</i>	pMF280	FGSC 9720	-	Diese Arbeit
2-HG	<i>Δbem1::hph; his3+::Pccg1-h1-gfp; Δmus52::bar+; A</i>	pMF280	2-A1	-	Diese Arbeit
N3-06	<i>his3+::Pccg1-gfp; A</i>	-	-	-	Louise Glass
2-G	<i>Δbem1::hph; his3+::Pccg1-gfp; Δmus52::bar; A</i>	pMF272	2-A1	-	Diese Arbeit
N3-07	<i>his3+::Pccg1-cherry; A</i>	-	-	-	Louise Glass
2-C	<i>Δbem1::hph; his3+::Pccg1-cherry; Δmus52::bar; A</i>	pMFcherry-10	2-A1	-	Diese Arbeit
2-BR	<i>Δbem1::hph; his3+::Pccg1-dsRED-bem1; Δmus52::bar+; A</i>	pbem1-dsred-2	2-A1	-	Diese Arbeit
BM-5	Heterokaryon aus 2-BR und N1-41	-	-	-	Diese Arbeit
2210	<i>Δbem1::hph; his3+::Pccg1-bem1-gfp</i>	-	-	W0103 x 21-A1	Diese Arbeit
W0103	<i>his3+::Pccg1-bem1-gfp; mat A</i>	pbem-gfp-W7	N1-03	-	Diese Arbeit
W0402	<i>his3+::Pccg1-bem1-gfp; mat A</i>	pbem-gfp-W7	N1-03	-	Diese Arbeit
CG-12	<i>his3::Pccg1-chs1-gfp; A</i>	pESL-01-1	N1-03	-	Diese Arbeit
2-CG-6	<i>Δbem1::hph; his3+::Pccg1-chs1-gfp; Δmus52::bar+; A</i>		2-A1	-	Diese Arbeit
GN1-76	<i>his3::Pccg1-spa2-gfp; A</i>	pUB161	N1-03	-	Ulrike Brandt
2-SPG-10	<i>Δbem1::hph; his3+::Pccg1-spa2-gfp; Δmus52::bar; A</i>	pUB161	2-A1	-	Diese Arbeit
Ste7G-13	<i>his3::Pccg1-ste7-gfp; A</i>	pSte7-gfp-13	N1-03	-	Diese Arbeit
FGSC 2489	<i>A</i>	-	-	-	FGSC
FGSC 988	<i>a</i>	-	-	-	FGSC
FGSC 4317	<i>fl A</i>	-	-	-	FGSC
FGSC 4347	<i>fl a</i>	-	-	-	FGSC

FGSC, Fungal Genetic Stock Center

Tabelle 2.5: Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Herkunft
pbembait68	<i>bem-1</i> cDNA mit Primern 156 und 157 (NdeI/EcoRI) in Plasmid pGBKT-7-BD kloniert	Diese Arbeit <sup>a</sup>
pMH-5.1	siehe Referenz	Fleissner <i>et al.</i> 2009
pSO-8	siehe Referenz	Fleissner <i>et al.</i> 2007
pMF272	siehe Anhang	FGSC
pbem1-ST-dPB1-8	PCR-Fragmente <i>via</i> YRC <sup>b</sup> rekombiniert und über <i>Xba</i> I und <i>Eco</i> RI in pMF272 kloniert	Diese Arbeit
pbem1-dPX-ST2	selbe Strategie wie für pbem1-ST-dPB1-8	Diese Arbeit

Tabelle 2.5: Plasmide - Fortsetzung

pbem1-dPX-gfp-ST3	PCR-Fragmente <i>via</i> YRC <sup>b</sup> rekombiniert und über <i>XbaI</i> und <i>PacI</i> in pMF272 kloniert	Diese Arbeit
pbem1-dSH3a-2	selbe Strategie wie für pbem1-ST-dPB1-8	Diese Arbeit
pbem1-dSH3b-2	selbe Strategie wie für pbem1-ST-dPB1-8	Diese Arbeit
pbem1-dSH3ab-1	selbe Strategie wie für pbem1-ST-dPB1-8	Diese Arbeit
pbem1-bem1-gfp-5	<i>bem-1</i> ORF zusammen mit 1kb <i>upstream</i> -Sequenz in pMF272 über <i>NotI</i> und <i>PacI</i>	Diese Arbeit <sup>a</sup>
pST-bem1-gfp-6	<i>bem-1</i> ORF in pMF272 über <i>XbaI</i> und <i>PacI</i>	Diese Arbeit
pMF280	<i>Pccg-1-gfp</i>	FGSC
pMFcherry-10	<i>cherry</i> aus pRSGT-B von Henning Schmidt in pMF272 kloniert	Ulrike Brandt
pMF334	<i>Pccg-1-dsRED</i>	FGSC
pbem1-dsred-2	<i>bem-1</i> ORF in pMF334 über <i>SpeI</i> und <i>XbaI</i>	Diese Arbeit <sup>a</sup>
pbem1-gfp-W7	<i>Pccg-1-bem-1-gfp</i> (lange MIPS-Annotierung)	Diese Arbeit
pSte7-gfp-13	<i>Pccg-1-ste-7-gfp</i>	Diese Arbeit
pESL-01-1	<i>Pccg-1-chs-1-gfp</i>	Meritxel Riquelme
pUB161	<i>Pccg-1-spa-2-gfp</i>	Ulrike Brandt
pCSN44	<i>hph</i>	AG Fleissner
pRS426	Rekombinationsvektor fürs YRC <sup>b</sup>	AG Fleissner
pGBKT-7-BD	<i>yeast-two-hybrid</i> - Plasmid mit Bindedomäne	Henning Schmidt

<sup>a</sup>Klonierung durch Ulrike Brandt; <sup>b</sup>YRC, yeast recombinational cloning

Tabelle 2.6: Primer

Primer	Sequenz
9	TCTAGAATGTCACGCGGTTTTAAGGC
10	TTAATTAATTCCACGTAAACGAGCAGC
11	TCTAGAATGCAATACAGCTTGCGTGAACC
13	TTCAAGAGGGAACCTCGGTTAGGA
55	TCTCGTGCCCGTCGCTTATTT
71	TCGGCATTGCGGCcGcACAAAGGAA
74	GTAACGCCAGGGTTTTCCAGTCACGACGGTTCACTCATCACCAGTTCC
75	ATCCACTTAACGTTACTGAAATCTCCAACCGATCCTATCTCTCATGTCC
76	CTCCTTCAATATCATCTTCTGTCTCCGACGGCTACATACACAAGCAAGG
77	GCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGCTGTCTACTTTGGGACTCTGG
82	GTCGGAGACAGAAGATGATATTGAAGGAGC
83	GTTGGAGATTTACAGTAACGTTAAGTGGAT
92	GCAAGGCACGCAGGCCATATAT
93	TCGTCCGAGGGCAAAGGAATAGAG
135	GCTTAAACAAACATCTAGAATGGCCGACCCATTT
136	CTCAACTTAATTAAAAATCGGCCAGTTGGAGGCTGCA
140	GCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGCGAATTCGCCATCTCGGTCAACATCCTGA
141	TGGCAATCTAGAATGTCACGCGGTTTTAAGGC
156	AAT GTA CAT ATG TCA CGC GGT TTT AAG GC
157	AAT GTA GAA TTC TTA TTC CAC GTA AAC GAG CAG C
197	CTTGTCTcTaGaCATCACCCCTCAGCACCACCATT
201	GTatAtgaattCTTaCATCTGTGAACCCACCTGCATAA
221	GTAACGCCAGGGTTTTCCAGTCACGACGTCTAGAATGTCACGCGGTTTTAAGGCTCT
224	TTCGTAATCACCCCTCGGGTGCGTATAGTGTGCGAGGT
225	ACACTATACGCACCCGAGGGTGATTACGAAATCGAC

Tabelle 2.6: Primer - Fortsetzung

234	TCCGTCATTAATTAATTCCACGTAAACGAGCAGC
248	TGGCAAAC TAGTATGT CACGCGGTTT TAAGGC
255	CCGCTATCGCGTTCCGTACGTCCAAGGGCCTGTGATAACAAGTTTAGCCTAAGCGCC
256	GGCGCTTAGGCTAAACTTGTTATCACAGGCCCTTGGACGTACGGAACGCGATAGCGG
257	CAGACCCGGGCGCCAAGTCTTCCGATGGGAACCATGGCTCCATTCTTGCCAGGCGTTTTTC
258	GAAAACGCCTGGCAAGAATGGAGCCATGGTTCCCATCGGAAGACTTGGCGGCCCGGGTCTG
259	GCCCTTGGACGTACGGAACGC
260	AACCATGGCTCCATTCTTGCCA

### 2.2.1 Konstruktion der *N. crassa* $\Delta bem-1$ Mutanten

Die *N. crassa*  $\Delta bem-1$  Mutanten wurden unter Verwendung des „*Neurospora Knockout Strain Kit*“-Protokolls des *Fungal Genetics Stock Center* (FGSC) durchgeführt (<http://www.dartmouth.edu/~neurosporagenome/>) (Colot *et al.*, 2006) (vgl. EG, Abschnitte 3.2.1 und 3.2.2). Die zur Transformation verwendete Deletionskassette wurde mit Hilfe des *yeast recombinational cloning* (YRC) (Colot *et al.*, 2006) zusammengestellt. Die hierfür verwendeten Primer-Sequenzen wurden vom *Neurospora Functional Genomics Project* zur Verfügung gestellt (<http://www.dartmouth.edu/~neurosporagenome/>). Die Deletionskassette wurde mit Hilfe von Elektroporation von Makrokonidien in die *N. crassa* Stämme FGSC 9719 und FGSC 9720 eingebracht (Margolin, 1997) (M&M, Abschnitt 2.3) Nach Selektion auf Hygromycin (200 µg/ml) wurden die Transformanten mit Hilfe eines Southern-Blots (Sambrook *et al.*, 1989) auf homologe *single-copy*-Integration der Deletionskassette überprüft. Homokaryotische  $\Delta bem-1$  Stämme wurden durch Einzelsporisolierung der Primärtransformanten erhalten. Hierzu wurden Makrokonidien auf Brockman & De Serres-Medium ausplattiert, welches 200 µg/ml Hygromycin enthielt (Brockman & De Serres, 1963). Die nach 14-stündiger Inkubation bei 30°C erhaltenen Kolonien, welche von einzelnen Sporen stammten, wurden in Schrägagar-Röhrchen transferiert, welche Minimal-Medium (MM) mit 200 µg/ml Hygromycin enthielten. Dieser Aufreinigungsschritt wurde bis zu drei mal für jeden Transformanten wiederholt. Der homokaryotische Zustand der nach dem letzten Aufreinigungsschritt isolierten Stämme wurde mittels PCR überprüft. Zu diesem Zweck wurden die *bem-1*-spezifischen Primer 13 und 55 sowie die *hygB*-spezifischen Primer 92 und 93 verwendet (vgl. Abb. 3.2).

### 2.2.2 Konstruktion von Stämmen auf Basis des Vektors pMF272

Der Vektor pMF272 (siehe Anhang, Abb. 5.1) diene als Grundlage für jegliche Konstrukte zur Expression von Fusionsproteinen und BEM-1-Derivaten. Der Vektor umfasst eine Hälfte des *his-3* Gens, welches in diesem Sequenzabschnitt im Empfängerstamm eine Punktmutation aufweist. Wird durch Transformation und Integration des Vektors am *his-3* Locus die Punktmutation eliminiert, so ist der entsprechende Stamm im Gegensatz zu seinem Ausgangsstamm Histidin-prototroph und kann auf Minimal-Medium ohne Zusatz von Histidin wachsen. Der auxotrophe Empfängerstamm benötigt hingegen eine Zugabe von 50 mg Histidin auf 100 ml Medium. Nach Isolierung der Histidin-prototrophen Transformanten werden diese über Isolierung von Konidiosporen unter Selektionsdruck auf Brockman & De Serres-Medium mehrere Runden aufgereinigt, um homokaryotische Stämme zu erhalten (Brockman & De Serres, 1963).

## 2.3 Elektroporation von *N. crassa*

Die Stämme wurden zunächst in 500 ml Erlenmeyerkolben mit Minimal-Medium-Agar (Vogel, 1956) für 10-14 Tage inkubiert. Das Luftmyzel wurde zusammen mit den Konidiosporen geerntet, indem es mit einem Spatel aufgenommen wurde. Nach Aufnehmen in 1 M Sorbitol und filtern über *Cheesecloth* wurde die Suspension für 5 min bei 3500 upm zentrifugiert, der Überstand abgegossen und durch frisches Sorbitol ersetzt. Dieser Waschschrift wurde noch zweimal wiederholt. Danach wurde die Sporensuspension zu einer zähflüssigen Suspension eingeeengt. 90 µl dieser Suspension wurden darauf mit 10 µl DNA (ca. 2-3 µg) in einer Elektroküvette elektroporiert. Hierbei wurde ein *Pulse Controller II* Elektroporator der Firma Biorad verwendet (1,5 kV, 600 Ω, 25 µF). Die elektroporierten Sporen wurden daraufhin mit 900 µl 1 M Sorbitol aufgenommen und zusammen mit Top-Agar auf Bottom-Agar-Platten ausplattiert.



## 2.4 Kreuzung und Aktivierung von Ascosporen

Zur Kreuzung von *N. crassa* wurden die weiblichen Kreuzungspartner auf Westergaard's Agarplatten angezogen. Auf diesem stickstoffarmen Medium wird die Bildung der weiblichen Vorfruchtkörper, den Protoperithezien, induziert. Die reifen, ca. 10-14 Tage alten Protoperithezien wurden mit Konidiosporen des männlichen Kreuzungspartners inokuliert. Hierzu wurden ca. 100-500 µl der Sporensuspension auf den Platten mit den weiblichen Protoperithezien ausgestrichen. Nach etwa 10 Tagen entwickeln sich reife Perithezien, welche die in ihren Asci gebildeten Ascosporen mit Druck heraus schleudern, so dass ein Großteil der Ascosporen an der Unterseite des Petrischalendeckels kleben bleibt. Mit etwa 1 ml Wasser werden diese Ascosporen aus dem Deckel in Suspension genommen und sind in dieser Suspension bei RT mehrere Jahre haltbar. Die Ascosporen wurden vor ihrer Keimung durch einen 10-20 minütigen Hitzeschock bei 58-59°C aktiviert. Anschließend wurden ca. 0,1 bis 1,0 µl der Suspension in einem Gesamtvolumen von 100 µl auf Glasperlen gegeben und auf Minimal-Medium-Agar ausplattiert. Nach ca. 18 h Inkubation bei RT konnten die gekeimten Ascosporen isoliert und in Schrägagar-Kulturröhrchen überführt werden.

## 2.5 Quantifizierung von Wachstumsraten und Sporenmengen

**2.5.1 Quantifizierung des linearen Hyphenwachstums:** Zur Quantifizierung des linearen Hyphenwachstums wurden sogenannte *Racetubes* verwendet. *Racetubes* sind ca. 40 cm lange Glasröhren mit einem Durchmesser von etwa einem Zentimeter. Die Röhren wurden zur Hälfte mit Agar-haltigem Nährmedium befüllt. An einer Seite wurden die Röhren mit Sporensuspensionen der entsprechenden Stämme angeimpft. Nach 24 h Inkubation bei RT wurde eine Referenz-Linie markiert. In den darauffolgenden Tagen wurde jeweils zur gleichen Zeit die innerhalb von 24 h durch Wachstum zurück gelegte Strecke gemessen.

**2.5.2 Quantifizierung des Lufthyphenwachstums:** Glasröhrchen welche 2 ml Flüssig-Minimalmedium (Vogel, 1956) enthielten wurden mit je 100 µl von zuvor über Cheesecloth gefilterten Sporensuspensionen ( $10^7 \text{ ml}^{-1}$ ) inokuliert. Die Röhrchen wurden mit Watte verschlossen und bei 26°C für 4 Tage inkubiert. Nach den ersten

24 h wurde die Höhe des sich gebildeten Luftmyzels als Referenz-Linie markiert. Drei Tage später wurde die Höhe des Luftmyzels bestimmt, indem der Abstand zwischen der Referenz-Linie und der erreichten Höhe gemessen wurde. Die Werte von mindestens drei Röhrchen pro Stamm wurden durch drei geteilt, um die durchschnittliche Wachstumsrate pro Tag zu ermitteln.

**2.5.3 Quantifizierung der Makrokonidien pro Kulturröhrchen:** Die Stämme wurden 10 Tage in Minimal-Medium Schrägagar-Röhrchen bei 30°C inkubiert. Die Sporen von mindestens 3 Schrägagar-Röhrchen pro Stamm wurden mit je 2 ml H<sub>2</sub>O durch 10-maliges kurzes anvortexen geerntet und über Cheesecloth filtriert. Je nach Konzentration der Suspension wurde 1:10 bzw. 1:50 oder 1:100 mit H<sub>2</sub>O verdünnt. Die Konzentration der Suspensionen wurde anschließend mit Hilfe einer Thoma-Kammer bestimmt und unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors auf das eingesetzte Volumen (2 ml) hochgerechnet.

**2.5.4 Quantifizierung der Mikrokonidien pro Kulturplatte:** Die Stämme wurden wie bereits beschrieben auf Kulturplatten mit H<sub>2</sub>O-Agar angezogen (Fleissner *et al.*, 2005). Nach 10 bis 14 Tagen sind die Mikrokonidien häufig in Form von kreisförmigen Ansammlungen auf dem Agar zu erkennen. Mit einem Drigalskispatel und einer ausreichenden Menge H<sub>2</sub>O wurden die Sporen von der Platte gewaschen und mit einem 5 µm-Filter (Diagonal, Art-Nr.: SLSV025LS) von den Makrokonidien getrennt.

## 2.6 Mikroskopische Analysen

### 2.6.1 Probenvorbereitung für die Mikroskopie

Wachstumsmedium für die Mikroskopie war entweder Vogel's Minimalmedium (Vogel 1956) oder Minimalmedium, welchem 1.2% Natriumacetat als alleinige C-Quelle zugesetzt wurde. Natriumacetat wurde dann verwendet, wenn eine Repression des *ccg-1* Promotors durch Glucose verhindert werden sollte. Proben von Makrokonidien-Keimlingen wurden vor der Mikroskopie für 2–3 h bei 30°C

angezogen, bis die ersten gerichteten Interaktionen zu sehen waren. Proben von reiferen vegetativen Hyphen wurden einer Kolonie entnommen, die über Nacht bei 30°C angezogen worden war. Quadrate mit der Kantenlänge von etwa 1 cm wurden so aus dem Agar ausgeschnitten, dass die Hyphenfusionen in der weniger dicht bewachsenen Peripherie der Kolonie gut beobachtet werden konnten. In einigen Fällen wurden die Keimlinge in Flüssig-Minimalmedium mit Hilfe von speziellen Mikroskopie-Kammern (Ibidi) am invertierten Mikroskop untersucht. Bei Versuchen, in denen das Flüssig-Medium mit Sauerstoff angereichert wurde, geschah dies mit Hilfe eines speziellen Kits der Firma Söchting Biotechnik GmbH aus dem Aquarienhandel.

### **2.6.2 Konventionelle Licht- und Fluoreszenzmikroskopie**

Die Proben wurden an einem Zeiss Axiophot-2 Mikroskop betrachtet, welche mit Nomarski-Optik und einem Zeiss Plan-Neofluar 100x/1.30 Öl-Immersionsobjektiv (440481) ausgestattet war. Als Lichtquelle für die Fluoreszenz-Anregung wurde eine Osram Quecksilber-Kurzbogenlampe HBO 100 W/2 verwendet. Die Bilder wurden mit Hilfe einer PCO Pixelfly Kamera eingefangen, welche über einen PC und einer von Schnabel *et al.* in C++ programmierten Software gesteuert wurde (Hutter & Schnabel, 1994, Schnabel *et al.*, 1997).

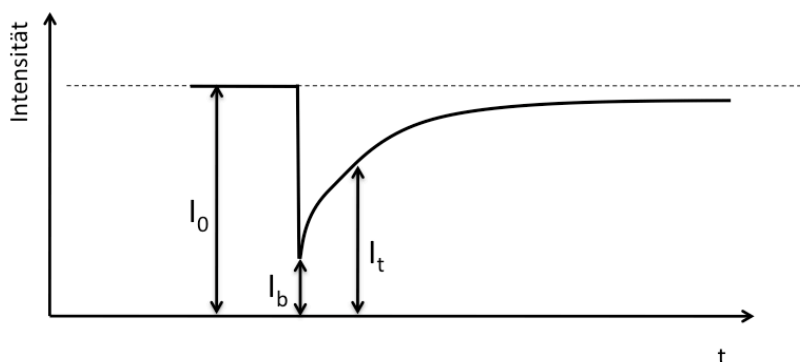
### **2.6.3 Deconvolutions-Mikroskopie im fluoreszierenden Weitfeld**

Die Proben wurden an einem Zeiss Axioplan-Imaging-2 Mikroskop betrachtet, welches mit Nomarski-Optik und einem Zeiss Plan-Neofluar 100x/1.30 Öl-Immersionsobjektiv (1031-172) ausgestattet war. Bilderstapel mit einem Increment von 200 nm und bis zu 40 fokalen Ebenen wurden mit Hilfe einer PCO Sensicam eingefangen. Sowohl die CCD-Kamera als auch der interne Antrieb zur Kontrolle der Höhe des Objektisches wurden über einen PC und einer von Schnabel *et al.* in C++ programmierten Software gesteuert. Als Lichtquelle für die Fluoreszenz-Anregung wurden LEDs verwendet, welche die benötigte Wellenlänge emittierten. Die Bilderstapel wurden mit Hilfe der *Huygens deconvolution software* von Scientific Volume Imaging (SVI) deconvoliert. Die Deconvolution geschah im *classic mode* mit

bis zu 150 möglichen Iterationen. 3-D Rekonstruktionen wurden mit Hilfe des MIP *renderer* (Huygens, SVI) durchgeführt.

#### 2.6.4 Laser Scanning Mikroskopie und FRAP

LSM Mikroskopie und FRAP Analysen (*fluorescence recovery after photobleaching*) wurden an einem Zeiss 510 Meta durchgeführt. Als Objektiv wurde ein C-Apochromat 40x/1.20 Wasser-Immersionsobjektiv verwendet. Als Lichtquelle für die Fluoreszenz-Anregung diente ein Argon-Laser. Zur FRAP Analyse wurde die zurückgewonnene Netto-Fluoreszenz-Intensität des entsprechenden ROIs (*region of interest*) für jeden Zeitpunkt in Relation zur Netto-Anfangsintensität gesetzt. Mit Netto-Fluoreszenz-Intensität ( $I_t - I_b$ ) ist die Intensität zu einem Zeitpunkt  $t$  gemeint, von der die direkt nach dem Bleichen gemessene Intensität ( $I_b$ ) abgezogen wurde. Die Netto-Anfangsintensität ( $I_0 - I_b$ ) ist die Intensität vor dem Bleichen ( $I_0$ ) abzüglich der Intensität direkt nach dem Bleichen ( $I_b$ ) (vgl. Abb 2.1).



**Abb. 2.1: Typischer Kurvenverlauf nach Photobleaching.** Erläuterungen siehe Text.

Dementsprechend wurde die relative Intensität zu einem bestimmten Zeitpunkt nach dem Bleichen ( $I_{t\text{ rel.}}$ ) wie folgt berechnet:

$$I_{t\text{ rel.}} = (I_t - I_b) / (I_0 - I_b) \times 100\%$$

wobei  $I_t$  die absolute Intensität zum Zeitpunkt  $t$  ist,  $I_0$  die absolute Intensität direkt vor dem Bleichen und  $I_b$  die absolute Intensität direkt nach dem Bleichen.

In einem ROI, der zur Kontrolle diente und in der selben Hyphe so weit weg wie möglich von der gebleichten Stelle platziert wurde, wurde das generelle Bleichen überprüft, das durch das Aufnehmen der Bilder hervorgerufen wurde. Die relativen Intensitäten ( $I_{t\text{ rel.}}$ ) wurden dementsprechend korrigiert:

$$I_{t \text{ rel. corr.}} = (I_{0 \text{ contr.}}/I_{t \text{ contr.}}) \times I_{t \text{ rel.}}$$

Hierbei ist  $I_{0 \text{ contr.}}$  die absolute Intensität in dem Kontroll-ROI direkt vor dem Bleichen und  $I_{t \text{ contr.}}$  die absolute Intensität im Kontroll-ROI zur Zeit  $t$ .

## 2.7 Quantifizierung der gerichteten Keimlingsinteraktionen

Die Stämme wurden auf Vogel's Minimalmedium (Vogel, 1956) in Schrägagar-Röhrchen 4–6 Tage angezogen, bis sich signifikante Mengen an Sporen gebildet hatten. Die Konidiosporen wurden geerntet durch vortexen der Röhrchen mit 2 ml ddH<sub>2</sub>O. Die Sporensuspensionen wurden über Cheesecloth filtriert, um sie von Hyphenbruchstücken zu befreien. Die Konzentration wurde auf  $\sim 2 \times 10^6$  Sporen/ml eingestellt und 300 µl wurden auf einer Minimal-Medium Agarplatte ausplattiert. Die Platten wurden bei 30°C für 3 bzw. 5 h inkubiert. Ca. 1 cm<sup>2</sup> große Quadrate wurden ausgeschnitten und mit einem konventionellen Mikroskop betrachtet. Jeder Keimling, der in einer gerichteten Interaktion involviert war, wurde 1 mal gezählt. Zwei Keimlinge wurden jeweils als nicht interagierend gezählt, wenn kein gerichtetes Wachstum beobachtet wurde und die entsprechenden Sporen nicht weiter weg voneinander entfernt lagen als 10 µm und die entsprechenden Keimschläuche mit einer Länge von mindestens 5 µm ausgewachsen waren. Keimlinge, die nicht mit einem benachbarten Keimling interagierten, der in einer anderen gerichteten Interaktion involviert war, wurden nicht gezählt.

## 2.8 Assay zur Evaluierung des gerichteten Wachstums der Trichogynen

Zur Evaluierung des gerichteten Wachstums der Trichogynen wurden H<sub>2</sub>O-Agarplatten (1,5 % Agar, Fa. DIFCO) in der Mitte mit Konidiosporen oder etwas Myzel des weiblichen Paarungspartners angeimpft und für 3 Tage in einer feuchten Kammer bei RT inkubiert. Daraufhin wurden die Platten für 3-5 weitere Tage ausserhalb der feuchten Kammer auf der Arbeitsplatte inkubiert, bis sich zahlreiche weibliche Vorfruchtkörper (Protoperithezien) gebildet hatten. Dünne 1 cm<sup>2</sup> große Patches 2 %igem Wasseragar wurden auf den Protoperithezien plaziert. 1 - 2 h später wurden etwa 1 - 2 Tropfen á 0,5 µl Konidiosporen-Suspension á 5-20 Sporen des

männlichen Paarungspartners auf die Patches gegeben. Nach weiteren 22 h Inkubation bei RT wurden die aus den Protoperithezien herauswachsenden Trichogynen mikroskopisch dahingehend untersucht, ob und wenn ja, auf welche Weise, sie gerichtet auf die Konidiosporen des Paarungspartners zuwachsen.

## 2.9 Quantifizierung der Keimlingsfusion / Fusionsporenbildung

Die zu untersuchten Stämme, welche entweder zytoplasmatisches GFP oder Cherry red exprimierten wurden auf Vogel's Minimal-Medium (Vogel, 1956) für 4-6 Tage in Schrägagar-Röhrchen angezogen. Sobald die Röhrchen gut durchsporuliert waren wurden die Konidiosporen geerntet, indem die Röhrchen mit 2 ml ddH<sub>2</sub>O gevortext wurden. Die Sporensuspensionen wurden über *Cheesecloth* gefiltern, um sie von Hyphenbruchstücken zu befreien. Die Konzentration der Sporensuspensionen wurde auf  $\sim 2 \times 10^6$  Sporen/ml eingestellt. Für jeden Versuch wurden je 500 ml Sporensuspension von den beiden GFP- und Cherry-exprimierenden Stämmen vermischt. 300 ml dieser Mischung wurden auf einer Minimal-Medium Agarplatte ausplattiert. Nach 2-4 h bei 30°C wurden 1 cm<sup>2</sup> große Quadrate ausgeschnitten und mit einem konventionellen Fluoreszenz-Mikroskop (Abschnitt 2.9) untersucht. Fusionsereignisse wurden für alle Keimlingspaare gezählt, die sowohl im roten als auch im grünen Kanal Fluoreszenz zeigten.

## 2.10 Molekularbiologische Methoden

**2.10.1 Isolierung von DNA aus *N. crassa*:** Zur Isolierung der DNA aus *N. crassa* wurde das Myzel aus Flüssigkulturen mit Hilfe eines Büchner-Trichters vom Medium getrennt und unter flüssigem Stickstoff gemörsert. Nach Zugabe von Lysis-Puffer wurde 0,5-1 h bei 60-65°C inkubiert. Nach Zugabe von Phenol-Chloroform wurde gevortext und darauf folgend bei max. Geschwindigkeit für 15 min zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde vorsichtig abgenommen und mit dem gleichen Volumen Isopropanol gefällt. Nach Zentrifugation wurde das DNA-Pellet mit 70% Ethanol gewaschen und daraufhin getrocknet. Die Resuspendierung erfolgte in H<sub>2</sub>O, welches 0,2 µg/µl RNase A enthielt.

**2.10.2 Isolierung von RNA aus *N. crassa*:** Die Isolierung von RNA aus *N. crassa* erfolgte mit Hilfe des NucleoSpin RNA Plant Kit von der Firma Macherey-Nagel. Der Probenaufschluss erfolgte mit Hilfe eines Beadbeaters.

**2.10.3 Amplifizierung von DNA mittels PCR:** DNA wurde entweder mit Hilfe der Taq Polymerase von NEB, der Phusion Polymerase von Finnzymes oder der LA Taq Polymerase von Takara nach Angaben der Hersteller amplifiziert.

**2.10.4 Klonierungen:** Klassische Klonierungen wurden mit Hilfe von *Escherichia coli* durchgeführt (Sambrook *et al.*, 1989). Restriktionen wurden mit Hilfe von Restriktionsenzymen und entsprechenden Reaktionspuffern von Fermentas oder New England Biolabs (NEB) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Ligationen wurden mit Hilfe der T4 DNA-Ligase von Fermentas nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Zur Einbringung der Plasmid-DNA wurden die elektrokompenten Zellen des Stammes XL1-Blue MRF' (Stratagene) mit Hilfe eines Elektroschocks transformiert (2,3 kV, 200  $\Omega$ , 25  $\mu$ F). Hierbei wurde ein *Pulse Controller II* Elektroporator der Firma Biorad verwendet.

**2.10.5 *E. coli* Plasmid-Präparation:** Zur *E. coli* Plasmid-Präparation wurden die Zellen über Nacht bei 37°C in LB-Medium unter Schütteln (180 rpm) inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurden die Zellen abzentrifugiert (13.000 rpm, 30 s). Das Pellet wurde in Lösung I resuspendiert und dann durch Zugabe von Lösung II alkalisch lysiert. Die darauffolgende Zugabe von Lösung III neutralisiert die Lösung durch das in ihr enthaltene Acetat und bewirkt das Ausfällen der hochmolekularen DNA. Durch Abzentrifugieren (16.000 rpm, 5 min) wurde die Plasmid-Lösung von der hochmolekularen DNA und den Zellresten getrennt. Die Plasmid-DNA wurde im Anschluss mit 100% Ethanol gefällt, zentrifugiert und das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen. Das in der Speedvac getrocknete Plasmid-Pellet wurde schließlich in H<sub>2</sub>O mit RNase (0,2  $\mu$ g/ $\mu$ l) aufgenommen.

**2.10.6 Yeast recombinational cloning (YRC):** Zur Rekombination in *S. cerevisiae* wurden die entsprechenden DNA-Fragmente unter Zugabe von Lithiumacetat nach Angaben von Colot *et al.* in die Zellen des Stammes FY 834 (FGSC 9721) transformiert (Colot *et al.*, 2006). Zur Isolierung der Plasmid-DNA wurde eine Plasmid-Präparation analog zu der von *E. coli* mit den Puffern I, II und III durchgeführt. Um den

Zellaufschluss zu begünstigen wurden die Zellen mit kleinen Glaskugeln (Durchmesser < 1 mm) versetzt und 3 mal für je 10 s im Beadbeater geschüttelt.

**2.10.7 Southern-Analyse:** Genomische DNA wurde mit Hilfe eines Southern-Blots in Anlehnung an Sambrook *et al.* analysiert (Sambrook *et al.*, 1989). Hierzu wurde die DNA zunächst mit den entsprechenden Restriktionsenzymen gespalten und daraufhin mit 3 M NaOAc pH 6,3 und 100% Ethanol 2 h bei -20°C gefällt. Die DNA wurde 15 min bei 16.000 upm zentrifugiert und das Pellett darauffolgend mit 70% Ethanol gewaschen, dann in der Speedvac kurz getrocknet und in H<sub>2</sub>O aufgenommen. Nach Auftrennung der DNA durch Gelelektrophorese wurde die DNA für 5-10 min mit 0,25 M HCl depuriniert und anschließend für 20 min in 0,4 M NaOH denaturiert. Darauffolgend wurde die DNA mit Hilfe eines NaOH-Kapillarblots auf eine Nylonmembran (Hybond XL, GE Healthcare) übertragen. Die Membran wurde anschließend mit einer  $\alpha$ -dCTP-radioaktiv markierten Sonde (Hartmann Analytic) hybridisiert. Hierzu wurde die Membran mit Hybridisierungslösung 1 - 2 h bei 65°C im Wasserbad schüttelnd vorhybridisiert. Die Sonde wurde 10 Minuten bei 100°C denaturiert, auf Eis abgekühlt, zur Membran in die Hybridisierungslösung gegeben. Inkubiert wurde über Nacht bei 65°C unter leichtem Schütteln. Darauf wurde die Membran mit 100 ml 2x SSPE-Waschpuffer für 5 min gewaschen. Es folgte ein Waschschrift für 15 Minuten mit vorgewärmtem 1x SSPE-Waschpuffer. Darauf wurde die Membran zwischen zwei Frischhaltefolien gelegt. Das radioaktive Signal auf der Membran wurde anschließend durch Exposition eines Röntgenfilms detektiert.

**2.10.8 Western-Analyse:** Zur Detektion von BEM-1-GFP Expression wurden die entsprechenden Stämme in Flüssigkultur 16 h bei 30°C schüttelnd inkubiert. Das Myzel wurde geerntet, indem es über einer Lage Miracloth (Calbiochem) filtriert wurde und direkt darauf in flüssigem Stickstoff eingefroren wurde. Die Protein-Extraktion und die SDS-Gelelektrophorese der Gesamtprotein-Extrakte wurde wie bereits beschrieben durchgeführt (Pandey *et al.*, 2004). Die Membranen wurden mit monoklonalem Maus-anti-GFP (Klone 7.1 und 13.1; Verdünnung, 1:1,000; Roche) und einem anti-Maus (schwere und leichte Kette) Peroxidase-Konjugat inkubiert (Verdünnung, 1:4,000; Invitrogen). Zur Kontrolle der Gelbeladung wurde der Blot gestrippt und mit monoklonalem anti- $\beta$ -Tubulin (Klon TU27; Verdünnung, 1:2,000; Covance) und einem sekundären anti-Maus-Antikörper (Verdünnung, 1:4,000, siehe oben) inkubiert. Die Proteine wurden mit Hilfe des *Super signal west pico*



Chemilumineszenz-Substrats detektiert (Thermo Fischer Scientific). Die Dichten der Banden auf Graustufen-Bildern von eingescannten Röntgen-Filmen wurden mit Hilfe des NIH ImageJ *software gel analyzer tools* miteinander verglichen. Die Bestimmung des Levels phosphorylierter MAP Kinase (MAK-2) während des gerichteten Wachstums der Keimlinge wurde durchgeführt wie in Pandey *et al.* beschrieben (Pandey *et al.*, 2004). Zusätzlich wurden zum Protein-Extraktionspuffer 60 mM  $\beta$ -Glycerolphosphat und 15 mM p-Nitrophenylphosphat zugegeben. Nach der Elektrophorese wurden die Proteine durch einen nassen Elektrobplot (Bio-Rad) auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran (Milipore) übertragen. Das Blocken und Hybridisieren wurde in einer 5% BSA-Lösung in Phosphat-gepufferter Saline (PBS) (+0.05% Tween20) durchgeführt. Die Membranen wurden mit anti-phospho p44/42 MAP Kinase-Antikörper (1:1,000 Verdünnung, #9101, Cell Signaling Technology) und anti-Kaninchen-Peroxidase-Konjugat IgG (1:100,000 Verdünnung, #7074, Cell Signaling Technology) inkubiert. Die Proteinbeladung wurde, wie oben beschrieben, mit Hilfe eines anti- $\beta$ -Tubulin-Antikörpers kontrolliert. Die Proteine wurden mit Hilfe des hoch sensitiven *Super signal west femto* Chemilumineszenz-Substrats (Thermo Fischer Scientific) und darauf folgender Exposition eines Röntgenfilms mit der lumineszierenden Membran detektiert.

**2.10.9 Bearbeitung von DNA- und Proteinsequenzen:** Sämtliche Bearbeitung von DNA- und Proteinsequenzen wurde mit Hilfe des Lasergene-Softwarepaketes Version 8.0.2 (DNASar, Inc.) durchgeführt.

# Ergebnisse

## 3.1 Identifizierung eines *bem-1* Homologs in *N. crassa*

Bei einer BLAST-Analyse (Altschul *et al.*, 1990) der Proteindatenbank des NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>) wurde das *N. crassa* Gen NCU06593 (*bem-1*) als Homolog des *bem-1* Gens in *S. cerevisiae* (EGA59743.1) identifiziert. Gemäß der Annotierung des BROAD Institutes (<http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/neurospora/>) besteht der *bem-1* ORF aus 1847 bp und enthält zwei Introns, welche beide eine Größe von 58 bp aufweisen. Das erste Intron befindet sich an Position 115-172 bp, während sich das zweite an Position 914-971 bp befindet. Das vorhergesagte Gen kodiert ein 576 Aminosäuren langes Protein mit einem Molekulargewicht von 63 kDa. Um die Vorhersagen zu bestätigen, wurde zunächst die cDNA von *bem-1* mit den Primern 156 und 157 (Tab. 2.6) über *Nde*I und *Eco*RI in das Plasmid pGBKT-7-BD kloniert und der positive Klon pbembait68 sequenziert. Bei einem Vergleich der cDNA-Sequenz mit der Sequenz der genomischen DNA konnte die vorhergesagte Anzahl der Introns sowie deren Längen und Positionen, bestätigt werden.

Das *N. crassa* BEM-1 weist eine Domänenstruktur auf, welche mit der des *S. cerevisiae* Bem1p identisch ist. Beide Proteine verfügen über zwei SH3-Domänen, welche sich in der N-terminalen Hälfte befinden, gefolgt durch eine PX-Domäne und eine PB1-Domäne in der C-terminalen Hälfte (siehe Abb. 3.1 und EL, Abschnitt 1.5).

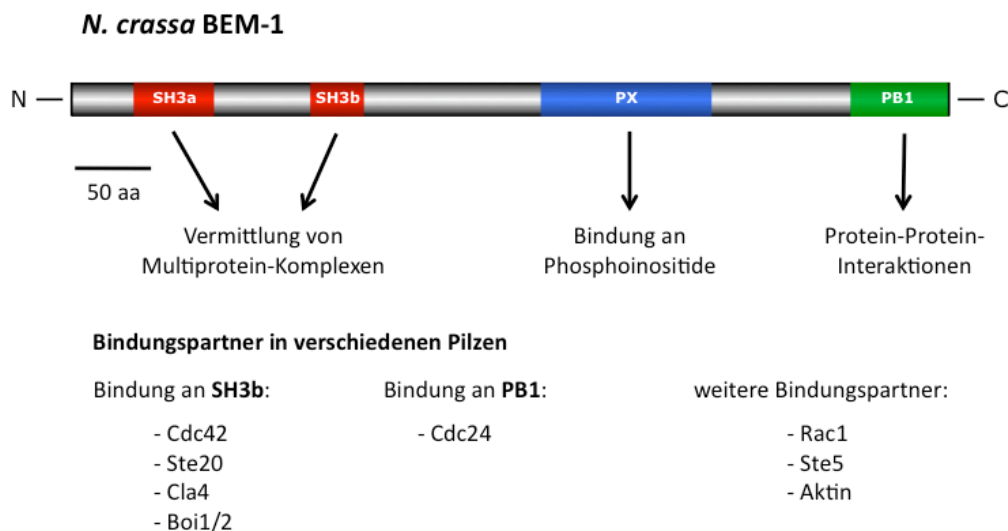


Abb. 3.1: Domänenstruktur von *N. crassa* BEM-1 und bekannte Interaktionspartner.

Um die Homologie beider Proteine besser bewerten zu können und darüber hinaus eine Vorstellung über die Homologien der einzelnen Domänen zu bekommen, wurden die entsprechenden Aminosäure-Sequenzen von *N. crassa* und *S. cerevisiae* mit dem *Needleman-Wunsch alignment tool* des *European Bioinformatics Institute* (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/>) miteinander verglichen (Tab. 3.1).

**Tab. 3.1: Globale Alignments der Proteindomänen und der vollständigen Sequenz von *N. crassa* BEM-1 mit den entsprechenden Sequenzen von Bem1p aus *S. cerevisiae*.** Die Anzahl der ähnlichen Aminosäuren setzt sich aus den identischen und den biochemisch ähnlichen Aminosäuren zusammen. Die Lücken im Alignment ergaben sich dann, wenn sich dadurch die Passgenauigkeit des gesamten Alignments erhöhte. Die Längen der Alignments und die der einzelnen Sequenzen sind durch die Anzahl der Aminosäuren (As.) angegeben. Die letzte Spalte zeigt die Werte für ein globales Alignment über die gesamte BEM-1 Proteinsequenz.

		SH3a	SH3b	PX	PB1	BEM1
Identische As.	(%)	50.9	47.6	42.7	25.6	30.4
Ähnliche As.	(%)	66.7	61.9	63.2	47.4	44.2
Lücken im Alignment	(%)	7.0	14.3	4.3	11.5	24.5
Länge des Alignments	(As.)	57	42	117	78	642
Länge der <i>N. crassa</i> Sequenz	(As.)	56	38	112	76	576
Länge der <i>S. cerevisiae</i> Sequenz	(As.)	45	40	117	72	551

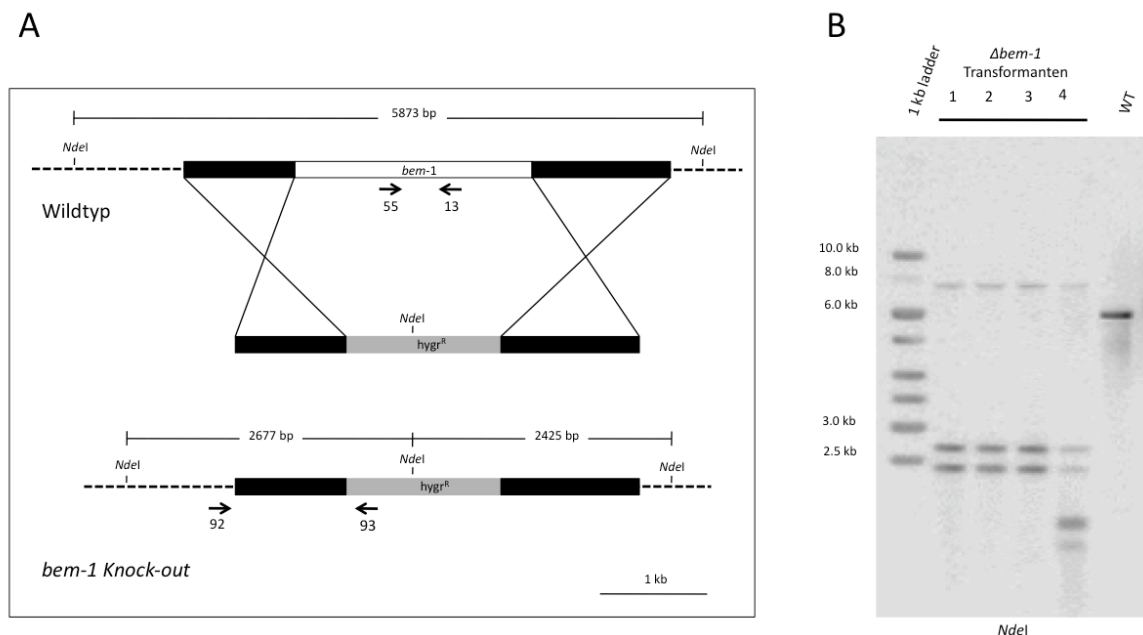
Der Vergleich über das gesamte Protein ergab ein Wert von 30,4 % identischer Aminosäuren. Die Analyse der einzelnen Domänen hinsichtlich ihrer Homologien zeigte, dass besonders die beiden SH3-Domänen sowie die PX-Domäne einen verhältnismäßig hohen Grad an identischen Aminosäuren aufwiesen (42,7-50,9 %). Demgegenüber zeigte die PB1-Domäne mit nur 25,6 % einen deutlich geringeren Anteil an identischen Aminosäuren. Dies könnte auf eine Sonderrolle der PB1-Domäne in *N. crassa* im Vergleich zu *S. cerevisiae* hindeuten, welche sich möglicherweise in einem veränderten Spektrum der Bindungspartner oder in der Qualität der Bindungen widerspiegelt.

### 3.2 Konstruktion einer $\Delta bem-1$ Deletionsmutante

Um zu untersuchen welchen Einfluss *bem-1* in *N. crassa* auf Wachstum, Entwicklung und die interzelluläre Kommunikation während der Zellfusion hat, wurde das Gen über homologe Rekombination deletiert.

### 3.2.1 Deletion von *bem-1* in Wildtyp-Stamm N1-05

Das Gen *bem-1* wurde zunächst in dem Wildtyp-Stamm N1-05 deletiert. Hierzu wurde eine Deletionskassette mittels *Yeast recombinational cloning* hergestellt (siehe Abschnitt 2.20). Diese Kassette enthält das Hygromycin-Resistenzgen *hph* als Markergen sowie die flankierenden 5'- und 3'-Bereiche des *bem-1* Gens (Abb. 3.2).



**Abb. 3.2: Schema der *bem-1* Deletionsstrategie (A) und Southern-Analyse (B) von vier *Δbem-1* Transformanten (N1-05 Hintergrund).** A, *hyg<sup>R</sup>*, Hygromycin-Resistenzkassette einschließlich *P<sub>trpC</sub>*-Promotor aus *A. nidulans*; Pfeile zeigen die Positionen der Primer für die diagnostische PCR an. B, in der Southern-Analyse wurde als Sonde die gesamte Deletionskassette verwendet, welche aus den homologen Flanken und der Hygromycin-Kassette besteht. Als Wildtyp-Kontrolle wurde DNA des Stammes N1-03 eingesetzt; DNA-Standard: 1kb DNA ladder SM0311 (Fermentas).

Beide flankierenden Bereiche weisen eine Größe von etwa ein kb auf. Die 5'-Flanke wurde mit den Primern 74 und 75 und die 3'-Flanke mit den Primern 76 und 77 aus genomischer DNA von *N. crassa* mittels PCR amplifiziert. Das Hygromycin-Resistenzgen inklusive Promotor wurde mit den Primern 82 und 83 von Plasmid pCSN44 amplifiziert. Die Sequenzen der verwendeten Primer wurden vom *Neurospora* Gen-Knockout Projekt erhalten (siehe [http://www.dartmouth.edu/~neurosporagenome/knockouts\\_completed.html](http://www.dartmouth.edu/~neurosporagenome/knockouts_completed.html)) (Colot *et al.*, 2006). Die Primer wurden so gewählt, dass die Fragmente für die 5'- und die 3'-Flanke sowohl mit dem mittels *EcoRI* und *XhoI* linearisierten Plasmid pRS426 als auch mit der Hygromycin-Kassette über ca. 30 Basen lange homologe Bereiche überlappten. Nach der Rekombination in *S. cerevisiae*, konnte die gesamte

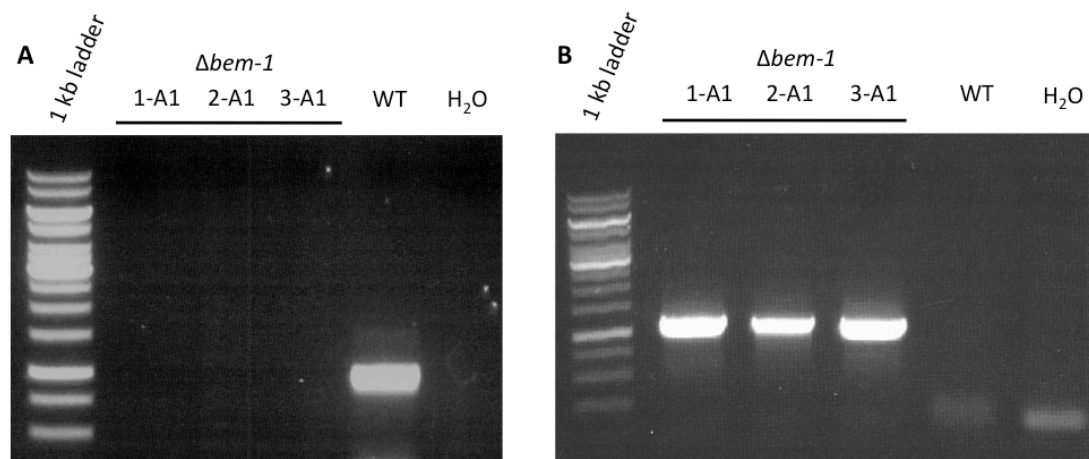
Deletionskassette aus der Hefe-DNA mit den Primern 74 und 77 mittels PCR amplifiziert werden. Dieses Fragment wurde in den Stamm N1-05 transformiert und danach auf Platte nach hygromycinresistenten Kolonien selektiert. Aus hygromycinresistenten Kolonien von vier Transformanten und dem Wildtyp-Stamm N1-03 wurde DNA isoliert und nach einem *NdeI*-Verdau in einem Southern-Blot analysiert. Als Sonde wurde die radioaktiv markierte Deletionskassette verwendet. Alle vier der untersuchten  $\Delta bem-1$  Transformanten zeigten in der Southern-Analyse die erwarteten zwei Fragmente bei 2677 bp und 2425 bp. Der Wildtyp-Kontrollstamm N1-03 zeigte ein erwartetes Fragment von 5873 bp (Abb. 3.2, B).

Die zusätzliche Bande bei 7,5 kb, welche bei den vier  $\Delta bem-1$  Transformanten auftauchte, lässt sich darauf zurück führen, dass der in der Sonde befindliche *PtpC*-Promotor an zwei Stellen im Genom der positiven Transformanten hybridisiert. Der *PtpC*-Promotor befindet sich zum einen vor dem Hygromycin-Resistenzgen als auch vor der Phosphinothricin-Resistenzkassette. Das die Phosphinothricin-Resistenz vermittelnde Gen *bar* wurde als Marker bei der Deletion des Gens *mus-52* eingesetzt, welches ein essentieller Faktor für das *nonhomologous end-joining* ist. Die Deletion von *mus-52* verhindert daher bei *N. crassa* die Integration von DNA an nicht homologen Abschnitten. Auf diese Weise wird bei Transformation mit homologer DNA unter den Transformanten eine effektive Rate von 100% homologer Integrationen erzielt (Ninomiya *et al.*, 2004). Im Gegensatz zum Empfängerstamm N1-05 war das Gen *mus-52* in dem Stamm N1-03 nicht durch eine Phosphinothricin-Resistenzkassette ersetzt. Dadurch ist die 7,5 kb Bande hier nicht zu sehen.

Während die Transformanten eins bis drei keine weiteren Banden aufwiesen und damit ausschließlich das *bem-1* Gen durch homologe Rekombination ersetzt worden war, zeigte der vierte Transformant zwei weitere Banden unterhalb von 2,5 kb. Folglich kam es bei Transformant vier offensichtlich zu einer zusätzlichen ektopischen Integration, d.h. einer Integration der Deletionskassette oder Teilen der Kassette an einem heterologen Ort im Genom.

Die Transformanten eins bis drei wurden daraufhin über Einzelsporisolierung aufgereinigt (siehe M&M, Abschnitt 2.2.1). Die aufgereinigten Stämme  $\Delta bem-1-1-A1$ ,  $\Delta bem-1-2-A1$  und  $\Delta bem-1-3-A1$  wurden jeweils mit Hilfe der PCR überprüft, um

sicherzustellen, dass es sich um homokaryotische  $\Delta bem-1$  Transformanten handelt. Zu diesem Zweck wurden die im *bem-1* ORF bindenden Primer 13 und 55 verwendet, mit denen es möglich war über ein 872 bp langes Amplifikat das *bem-1* Gen nachzuweisen. Dieses Fragment konnte nur mit der Wildtyp-DNA des Stammes N1-05 amplifiziert werden, nicht aber mit DNA aus den drei aufgereinigten  $\Delta bem-1$  Stämmen (Abb. 3.3, A). Als Kontrolle zur Identifikation von  $\Delta bem-1$  Transformanten wurde Primer 92 in Kombination mit Primer 93 verwendet. Primer 92 bindet vor der 5'-Flanke der Deletionskassette und wird in Richtung *hph*-Gen verlängert, während der Gegenprimer 93 innerhalb des *hph*-Gens bindet (vgl. Abb. 3.2). Beide Primer amplifizieren zusammen ein 1195 bp großes Fragment. Dieses Fragment konnte mit der DNA der drei  $\Delta bem-1$  Transformanten amplifiziert werden, jedoch nicht bei Verwendung der Wildtyp-DNA (Abb. 3.3, B).



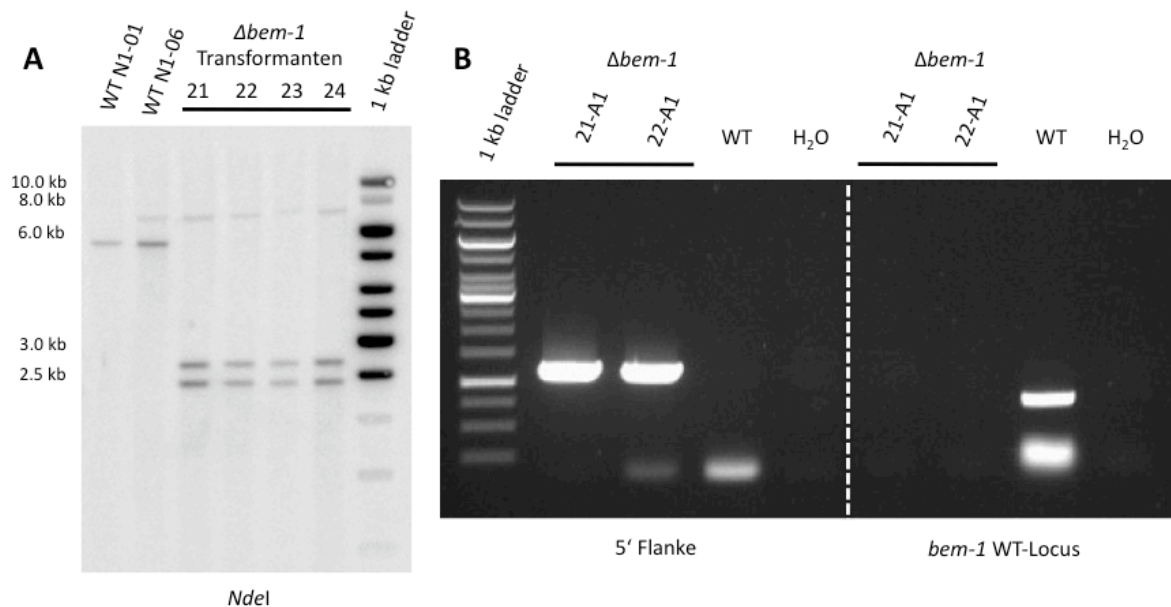
**Abb. 3.3: Diagnostische PCR zur Überprüfung der genetischen Reinheit der aufgereinigten  $\Delta bem-1$  Stämme 1-A1, 2-A1 und 3-A1.** A, Die PCR mit den Primern 13 und 55 weist den *bem-1* Wildtyp-Locus nach (872 bp). B, Die PCR mit den Primern 92 und 93 weist den  $\Delta bem-1$  Knock-out nach (1195 bp). DNA-Standard: 1kb DNA ladder SM0311 (Fermentas).

Auf diese Weise konnte das Ergebnis der Southern-Analyse bestätigt werden. Das Ausbleiben eines Amplifikates bei Verwendung der *bem-1* Wildtyp-Primer (13 und 55) in Kombination mit der DNA der drei aufgereinigten  $\Delta bem-1$  Stämme zeigt, dass diese drei Stämme keine Wildtyp-Kerne mehr enthalten und damit homokaryotisch sind.

Der für die *bem-1* Deletion verwendete Empfängerstamm N1-05 trägt den auxotrophen Marker *his-3*, welcher als Selektionsmarker dient, um rekombinante DNA am *his-3*-Locus zu integrieren (siehe M&M, Abschnitt 2.2.2). Da dieser Marker jedoch bei der phänotypischen Analyse einer Knock-out-Mutante unerwünscht ist, sollte er aus der  $\Delta$ *bem-1*-Mutante wieder ausgekreuzt werden. Wie sich jedoch herausstellte, führte die Deletion von *bem-1* zu einem Defekt in der Ascosporen-Keimung (siehe Abschnitt 3.3.9). Da sich die  $\Delta$ *bem-1*-Mutante somit nicht kreuzen ließ, wurde das Gen *bem-1* zusätzlich in dem Wildtyp-Stamm N1-06 deletiert, welcher nicht Histidin-auxotroph ist.

### 3.2.2 Deletion von *bem-1* in Wildtyp-Stamm N1-06

Analog zur Deletion von *bem-1* in Stamm N1-05 wurde der Stamm N1-06 mit der selben Deletionskassette transformiert (vgl. Abschnitt 3.2.1). Vier Transformanten wurden mittels Southern-Blot auf homologe Integration der Deletionskassette und eventuelle ektopische Integrationen hin untersucht (siehe Abb. 3.4, A). Alle vier Transformanten (Nr. 21-24) zeigten die erwarteten Banden für eine homologe Integration der Deletionskassette (2677 bp und 2425 bp) sowie die zusätzliche Bande bei 7,5 kb, welche aus der Kreuzhybridisierung der Sonde am *P<sub>trpC</sub>*-Promotor der *mus-52*-Deletionskassette resultiert (vgl. Abschnitt 3.2.1). Diese Bande ist den Erwartungen gemäß auch beim  $\Delta$ *mus-52* Wildtyp-Stamm N1-06, nicht aber beim *mus-52*<sup>+</sup> Wildtyp-Stamm N1-01 zu sehen (Abb. 3.4, A). Mit Hilfe der Southern-Analyse konnte somit nachgewiesen werden, dass das *bem-1* Gen in den Transformanten 21-24 durch homologe Rekombination deletiert wurde und keine zusätzlichen ektopischen Integrationen der Deletionskassette stattgefunden haben.



**Abb. 3.4: Southern-Analyse (A) und diagnostische PCR (B) der  $\Delta bem-1$  Transformanten (N1-06 Hintergrund).** **A**, Die DNA der untersuchten Stämme wurde mit *NdeI* verdaut. Als Sonde wurde die Deletionskassette verwendet, welche aus den homologen Flanken und der Hygromycin-Kassette besteht. Als Wildtyp-Kontrollen wurde die DNA des Stammes N1-01 (*mus-52<sup>+</sup>*) und die des Empfängerstammes N1-06 (*Δmus-52*) eingesetzt. Für den Wildtyp wurde ein 5873 bp großes Fragment, für die  $\Delta bem-1$  Transformanten jeweils zwei Fragmente der Größen 2677 bp und 2425 bp erwartet (vgl. Abb. 3.2). DNA-Standard: 1kb DNA ladder SM0311 (Fermentas); **B**, diagnostische PCR mit den Primern 92 und 93 zur Bestätigung des  $\Delta bem-1$  Knock-outs (1195 bp, linke Gelhälfte, vgl. Abb. 3.2). Die PCR mit den Primern 13 und 55 diente dem Nachweis des *bem-1* Wildtyp-Locus (872 bp, rechte Gelhälfte). DNA-Standard: 1kb DNA ladder SM0311 (Fermentas).

Die beiden  $\Delta bem-1$  Transformanten 21 und 22 wurden über Einzelsporisolation aufgereinigt (M&M, Abschnitt 2.2.1). Anschließend wurden die aufgereinigten Stämme  $\Delta bem-1$ -21-A1 und  $\Delta bem-1$ -22-A1 mittels diagnostischer PCR untersucht. Beide Stämme zeigten die charakteristische Bande für den *bem-1* Knock-out bei 1195 bp (Abb. 3.4, B). Ein Wildtyp *bem-1* locus konnte bei keinem der beiden Stämme nachgewiesen werden. Somit können die Stämme 21-A1 und 22-A1 als reine  $\Delta bem-1$  Knock-out Stämme angesehen werden.

### 3.2.3 Komplementation der *bem-1* Deletion in Stamm 21-A1

Die  $\Delta bem-1$  Mutanten zeigten deutliche Defekte in ihrer vegetativen und sexuellen Entwicklung, welche in Abschnitt 3.3 näher beschrieben werden. Um zu zeigen, dass allein die Deletion von *bem-1* die beobachteten Defekte verursachte, wurde ein *bem-1-gfp* Konstrukt unter der Kontrolle des *ccg-1* Promotors in die  $\Delta bem-1$  Mutante



21-A1 eingebracht. Ein *Pccg-1-bem-1-gfp* Konstrukt wurde deshalb gewählt, weil der entsprechende Stamm später zur Untersuchung der subzellulären Lokalisation und Dynamik von BEM-1 in *N. crassa* verwendet werden sollte. Der *ccg-1* Promotor wird in *N. crassa* in der Regel für die Expression von Fusionsproteinen verwendet, die mittels *live-cell imaging* untersucht werden sollen (Freitag *et al.*, 2004).

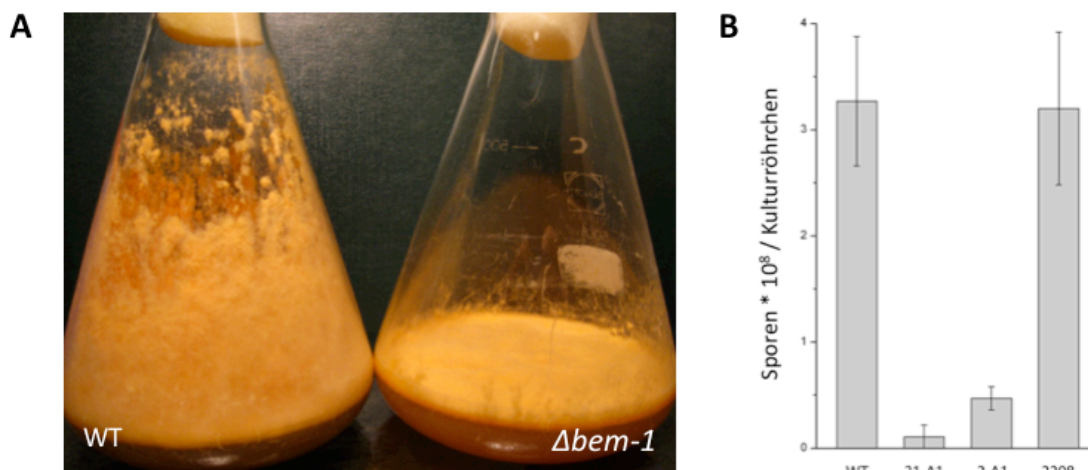
Zur Komplementation des  $\Delta bem-1$  Stammes wurde zunächst die Sequenz des *bem-1* ORFs mithilfe der Primer 9 und 10 von genomischer DNA mit Hilfe einer PCR amplifiziert und über *Xba*I und *Pac*I in den Vektor pMF272 kloniert. Auf diese Weise wurde *bem-1* direkt hinter den *ccg-1* Promotor kloniert, so dass das *gfp* mit dem 3'-Ende von *bem-1* fusioniert wurde. Der Vektor pST-bem1-gfp-6, welcher das *Pccg-1-bem-1-gfp* Konstrukt beinhaltet, wurde in den Histidin-auxotrophen *bem-1* Wildtyp-Stamm N1-03 transformiert. Da eine erfolgreiche Integration des Vektors am *his-3*-Locus die Histidin-Auxotrophie komplementieren sollte, wurde auf Histidin prototrophe Kolonien selektioniert. Nach der Aufreinigung über Einzelsporisolierung zeigte der Stamm N3-335-A1 eine deutliche GFP-Expression. Um das am *his-3*-Locus befindliche *bem-1-gfp* Konstrukt schließlich mit der  $\Delta bem-1$  Deletion zu rekombinieren, wurde der Stamm N3-335-A1 mit der  $\Delta bem-1$  Mutante 21-A1 (vgl. Abschnitt 3.2.2) gekreuzt. Aus dieser Kreuzung wurden 20 Nachkommen isoliert, von denen sechs hygromycinresistent und damit Träger der *bem-1* Deletion waren. Von diesen sechs Nachkommen waren drei Nachkommen deutlich GFP positiv. Der Stamm 2208 zeigte eine besonders deutliche GFP-Fluoreszenz und wurde daher für die geplanten Charakterisierungen ausgewählt.

### 3.3 Phänotypische Charakterisierung der $\Delta bem-1$ Mutante

Zur Charakterisierung des  $\Delta bem-1$  Phänotyps wurde der Stamm 21-A1 ( $his-3^+$ ) untersucht. Der Wildtyp-Stamm N1-06 diente hierbei als Referenz-Stamm. In einigen Experimenten wurde zusätzlich der Stamm  $\Delta bem-1-2-A1$  ( $his-3^-$ ) mitgeführt. Dieser Stamm wurde später bei Komplementierungsversuchen mit verschiedenen *bem-1*-Konstrukten verwendet, bei denen die unterschiedlichen Domänen deletiert wurden. Der auxotrophe Marker *his-3* wurde hierbei als Selektionsmarker verwendet (M&M, Abschnitt 2.2.2). Ebenso wurde in einigen Experimenten der Stamm 2208 mitgeführt, in dessen Genom das funktionelle *bem-1* Gen zur Komplementierung der  $\Delta bem-1$ -Deletion integriert worden war (vgl. Abschnitt 3.2.3).

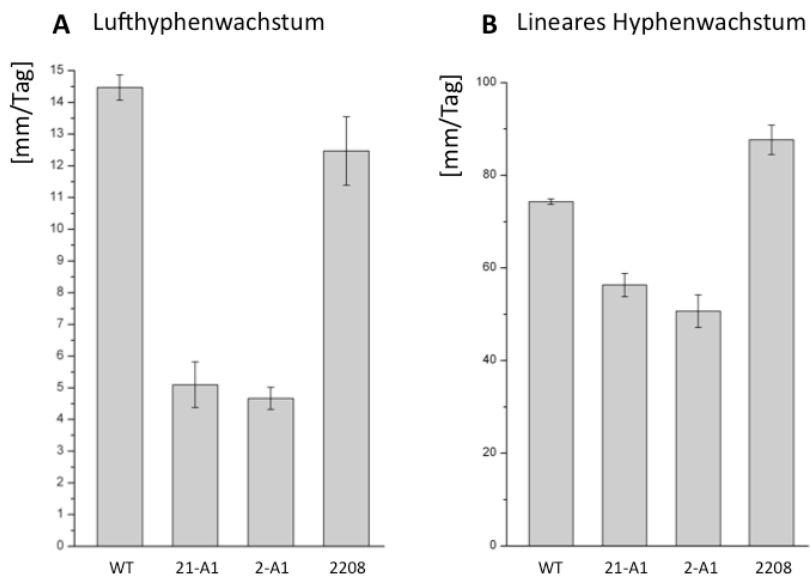
#### 3.3.1 Die $\Delta bem-1$ Mutante zeigt Defekte in Lufthyphen- und Sporenbildung sowie einen generellen Wachstumsdefekt

Makroskopisch zeigte die  $\Delta bem-1$  Mutante in Schrägagar-Röhrchen und Erlenmeyer-Kolben klare phänotypische Unterschiede zum Wildtyp. Sowohl die Produktion von Lufthyphen als auch die Makrokonidienbildung sind in der Mutante deutlich reduziert (Abb. 3.5).



**Abb. 3.5: Die  $\Delta bem-1$  Mutante zeigt starke Defekte in der Bildung von Luftmyzel und Makrokonidien.** **A**, Die Luftmyzelbildung der  $\Delta bem-1$  Mutante ist stark eingeschränkt. Das Foto zeigt den Wildtyp N1-06 und die Mutante  $\Delta bem-1-21-A1$  auf Festmedium (MM) in Erlenmeyerkolben, 7 Tage nach Inokulation. **B**, Makrokonidienbildung (Sporen pro Kulturröhrchen) von Wildtyp N1-06,  $\Delta bem-1-21-A1$ ,  $\Delta bem-1-2-A1$  und 2208 (komplementierter Stamm); Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten; numerische Angaben siehe Anhang, Tab. 5.1.

Eine Quantifizierung ergab, dass die  $\Delta bem-1$  Mutante ca. 86-97 % weniger Makrokonidien pro Kulturröhrchen bildete (Abb. 3.5, B). Das Lufthyphenwachstum war um etwa 65-68 % reduziert (Abb. 3.6, A).



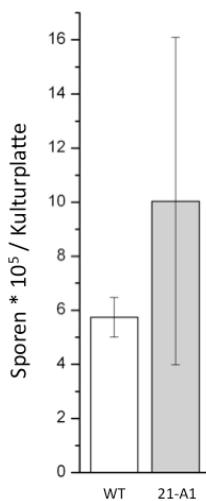
**Abb. 3.6: Die  $\Delta bem-1$  Mutante zeigt reduziertes Lufthyphenwachstum (A) sowie reduziertes lineares Hyphenwachstum (B).** Stämme: Wildtyp N1-06,  $\Delta bem-1-21-A1$ ,  $\Delta bem-1-2-A1$  und 2208 (komplementierter Stamm); Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten; numerische Angaben siehe Anhang, Tabellen 5.2 und 5.3.

Die Bestimmung des linearen Hyphenwachstums auf Festmedium zeigte, dass die  $\Delta bem-1$  Mutanten eine um 24-32 % reduzierte Wachstumsrate im Vergleich zum Wildtyp N1-06 aufwiesen (Abb. 3.6, B).

Sowohl die reduzierte Makrokonidien- und Luftmyzelbildung als auch das reduzierte Wachstum der linear wachsenden Hyphen konnten durch das Einbringen von funktionalem *bem-1* in die  $\Delta bem-1$  Mutante vollständig komplementiert werden (Stamm 2208; Abb. xx und yy).

Die Bildung der Makrokonidien in *N. crassa* weist Ähnlichkeiten zur Knospung in *S. cerevisiae* auf (Springer, 1993). Parallelen zur Hefe-Knospung finden sich auch in der Bildung der Mikrokonidien (EL, Abschnitt 1.3.3). Um zu prüfen, ob in der  $\Delta bem-1$  Mutante analog zur Produktion der Makrokonidien die Produktion der Mikrokonidien ebenfalls eingeschränkt ist, wurde die Anzahl der Mikrokonidien pro Kulturplatte bestimmt. Die  $\Delta bem-1$  Mutante wies diesbezüglich keinen signifikanten

Unterschied zum Wildtyp auf. Die Anzahl der  $\Delta bem-1$  Mikrokonidien pro Kulturplatte belief sich auf ca.  $10 \times 10^5$  Sporen (Abb. 3.7).



**Abb. 3.7: Die Produktion der Mikrokonidien in der  $\Delta bem-1$  Mutante zeigt keinen signifikanten Unterschied im Vergleich zum Wildtyp.** Stämme: Wildtyp N1-06 und  $\Delta bem-1$ -21-A1; Fehlerbalken repräsentieren Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten; numerische Angaben siehe Anhang, Tab. 5.4.

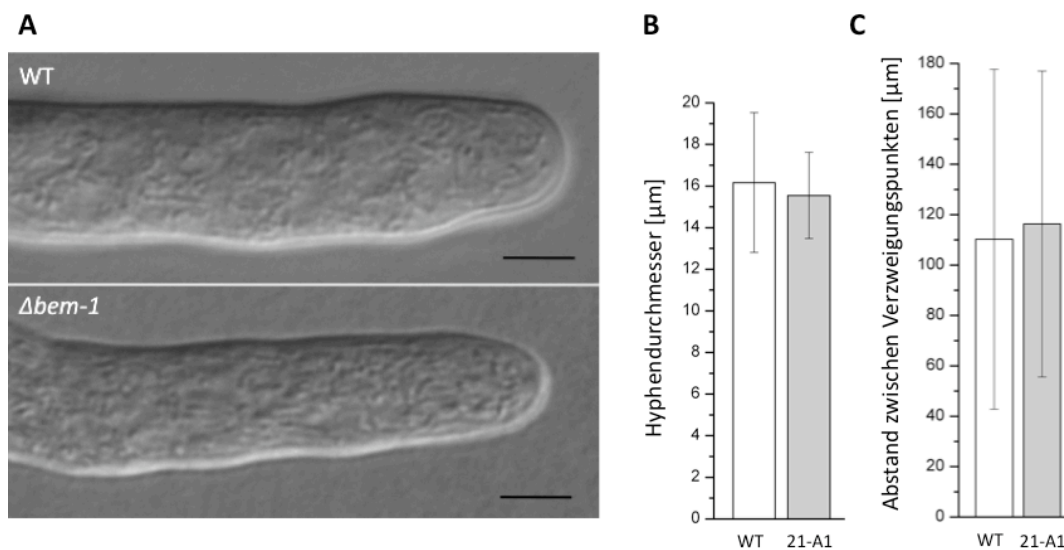
Die große Standardabweichung der  $\Delta bem-1$  Messwerte spiegelt die hohe Variabilität der Sporenmengen wider. Die Quantifizierung zeigt jedoch zum einen, dass die  $\Delta bem-1$  Mutante grundsätzlich in der Lage ist, Mikrokonidien zu produzieren und zum anderen, dass die Anzahl der gebildeten Mikrokonidien im Vergleich zum Wildtyp nicht signifikant reduziert ist.

Eine mikroskopische Begutachtung der äußeren Form der  $\Delta bem-1$  Mikrokonidien zeigte ebenfalls keine klaren Unterschiede im Vergleich zum Wildtyp.

Abschließend lässt sich zusammen fassen, dass die  $\Delta bem-1$  Mutante deutliche Defekte sowohl bei der Makrokonidien- und Luftmyzelbildung als auch hinsichtlich des linearen Hyphenwachstums aufweist. Die Mikrokonidienbildung ist jedoch nicht signifikant reduziert.

### 3.3.2 Die vegetativen Hyphen der $\Delta bem-1$ Mutante zeigen hinsichtlich ihrer Morphologie keine Unterschiede zum Wildtyp

Das Bem1p Protein in *S. cerevisiae* ist ein wesentlicher Bestandteil der Zellpolaritätsmaschinerie (vgl. EL, Abschnitt 1.5). Defekte, welche die Zellpolarität betreffen, können sich in filamentösen Pilzen unter anderem auf das lineare Hyphenwachstum, die Hyphenmorphologie oder den Grad der Verzweigungen vegetativer Hyphen auswirken (vgl. EL, Abschnitt 1.3.2). Eine mikroskopische Untersuchung der vegetativen *N. crassa*  $\Delta bem-1$  Hyphen zeigte keine signifikanten morphologischen Unterschiede im Vergleich zum Wildtyp. Die Ausrichtung der wachsenden Hyphenspitzen zeigte keine abweichenden Auffälligkeiten. Ebenso wenig der Hyphendurchmesser und der durchschnittliche Abstand zwischen den Verzweigungspunkten (Abb. 3.8).



**Abb. 3.8: Die Morphologie der vegetativen Hyphen der  $\Delta bem-1$  Mutante zeigt keinen signifikanten Unterschied im Vergleich zum Wildtyp.** **A**, Nomarski-Aufnahmen vegetativer Hyphen von Wildtyp N1-06 und  $\Delta bem-1$ -21-A1 auf MM-Agar; Größenbalken = 5  $\mu\text{m}$ . **B**, Durchmesser vegetativer Hyphen in  $\mu\text{m}$ , Fehlerbalken repräsentieren Standardabweichung, (n= 50) **C**, Abstand zwischen den Verzweigungspunkten vegetativer Hyphen in  $\mu\text{m}$ , Fehlerbalken repräsentieren Standardabweichung, (n= 50); Stämme in B und C: Wildtyp N1-06 und  $\Delta bem-1$ -21-A1; numerische Angaben siehe Anhang, Tabellen 5.5 und 5.6.

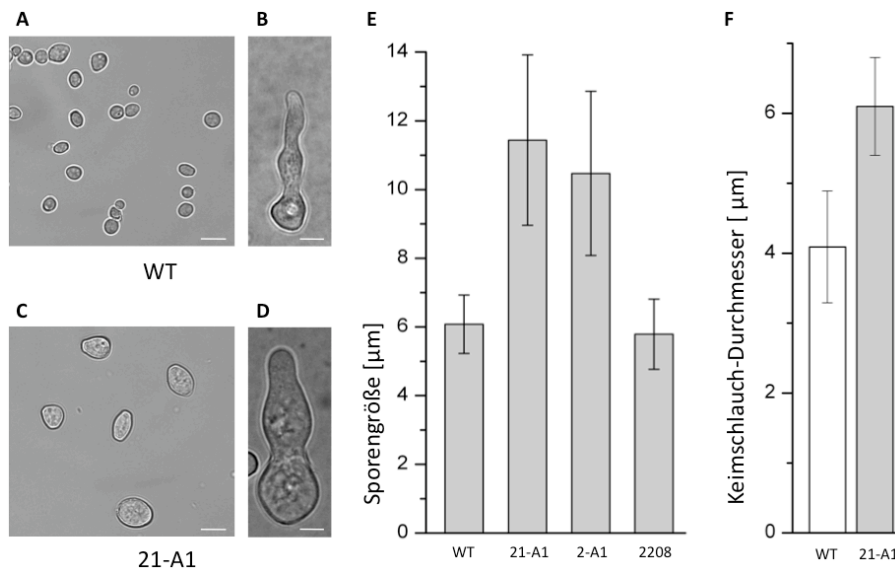
Folglich konnten beim Vergleich der vegetativen Hyphen der  $\Delta bem-1$  Mutante mit denen des Wildtyps keine morphologischen Unterschiede festgestellt werden, welche auf einen Zellpolaritäts-Defekt hindeuten würden.

### 3.3.3 Die *Δbem-1* Konidiosporen zeigen eine mit dem Wildtyp vergleichbare Keimungskinetik

Im Fokus der vorliegenden Arbeit liegt die Untersuchung der interzellulären Kommunikation während der Zellfusion in *N. crassa*. Von besonderem Interesse ist die Fusion der Konidiosporen-Keimlinge. Grundvoraussetzungen für diese Art von Zellfusion ist zunächst die Ausbildung von Zellpolarität während der Sporenkeimung und später die Steuerung des Wachstums in die richtige Richtung, d.h. dem Fusionspartner entgegen (EL, Abschnitt 1.3.1 bzw. 1.2). Aus diesem Grund wurden die Konidiosporen der *Δbem-1* Mutante zunächst auf Defizite in der Keimung untersucht. Nach einer dreistündigen Inkubation auf MM-Agar bei 30°C waren  $81 \pm 6$  % der *Δbem-1* Sporen gekeimt, während  $76 \pm 7$  % der Wildtyp-Sporen gekeimt waren. Wie in den anderen Experimenten zur Charakterisierung der phänotypischen Besonderheiten der *Δbem-1* Mutante wurde hierbei der Stamm *Δbem-1*-21-A1 mit dem Wildtyp-Stamm N1-06 verglichen. Die Ergebnisse zeigen keinen signifikanten Unterschied in der Keimungsrate zwischen *Δbem-1* Mutante und Wildtyp. Zudem konnte keine zeitliche Verzögerung in der Sporenkeimung beobachtet werden. BEM-1 hat demnach keinen Einfluss auf die Keimung der Konidiosporen in *N. crassa*.

### 3.3.4 Die *Δbem-1* Mutante produziert deutlich größere Makrokonidien im Vergleich zum Wildtyp

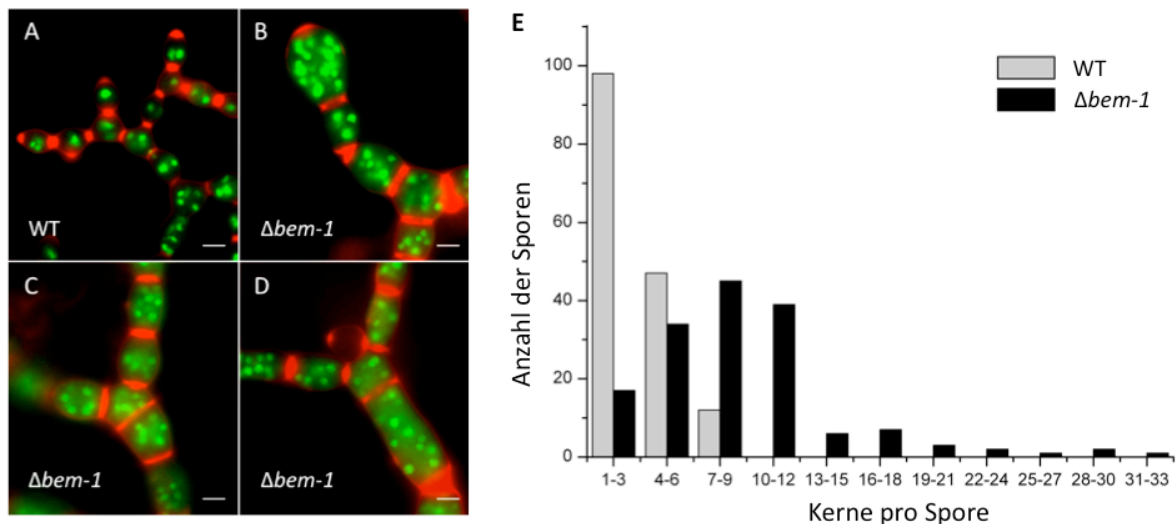
Bei mikroskopischer Betrachtung der keimenden *Δbem-1* Konidiosporen wurde deutlich, dass diese im Vergleich zum Wildtyp erheblich größer sind. Es stellte sich daher die Frage, ob dieser Effekt durch verstärktes isotropes Wachstum während der Keimung herbeigeführt wurde oder ob er bereits durch einen Defekt während der Konidienbildung hervorgerufen wurde. Eine Quantifizierung von frisch geernteten Sporen ergab, dass die Konidien der *Δbem-1* Mutante im Durchschnitt fast die doppelte Größe der Wildtyp-Konidien erreichen (Abb. 3.9). Der Größenunterschied ergibt sich folglich bereits durch Defekte in der Konidienbildung und nicht durch verstärktes isotropes Wachstum während der Keimung. Der mit funktionalem *bem-1* komplementierte Stamm 2208 (Abschnitt 3.2.3) produzierte wiederum kleine Sporen von der Größe der Wildtyp-Sporen (Abb 3.9, E).



**Abb. 3.9: Die Konidiosporen und Keimschläuche der  $\Delta bem-1$  Mutante sind deutlich größer im Vergleich zum Wildtyp. A-D**, Nomarski-Aufnahmen von Konidiosporen und Keimlingen von Wildtyp N1-06 und  $\Delta bem-1$ -21-A1; Größenbalken in A+C = 10  $\mu\text{m}$ ; Größenbalken in B+D = 5  $\mu\text{m}$ ; **E+F**, Größe der Sporen (E) und Durchmesser der Keimschläuche (F) in  $\mu\text{m}$ ; Fehlerbalken repräsentieren Standardabweichung, (n = 3 x 50 Sporen bzw. n = 50 Keimschläuche); Stämme: Wildtyp N1-06,  $\Delta bem-1$ -21-A1,  $\Delta bem-1$ -2-A1 und 2208 (komplementierter Stamm); numerische Angaben siehe Anhang, Tabellen 5.7 und 5.8.

Die Keimschläuche von frisch gekeimten  $\Delta bem-1$  Sporen sind ebenfalls signifikant dicker (Abb. 3.9, F). Der Durchmesser reifer vegetativer  $\Delta bem-1$  Hyphen unterscheidet sich jedoch nicht mehr von dem der Wildtyp-Hyphen (vgl. Abb. 3.8, B; Abschnitt 3.3.2). Somit scheint sich dieser Effekt im Laufe der Entwicklung der Pilzkolonie zu verlieren.

Aufgrund der Defekte in der Konidienbildung wurde die Beschaffenheit der Konidiophore der  $\Delta bem-1$  Mutante näher untersucht. Zu diesem Zweck wurden die Konidiophore des  $\Delta bem-1$  Stammes 2-HG mit *Calcofluor-white* angefärbt und fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Der Stamm 2-HG exprimiert H1-GFP, welches die Detektion der Zellkerne ermöglicht. Die Färbung mit *Calcofluor-white* diente der Sichtbarmachung der Zellwände und Septen. Verglichen mit dem Wildtyp-Stamm WT-HG, welcher recht gleichmäßig geformte Sporen produzierte, fanden sich am Konidiophor der  $\Delta bem-1$  Mutante Sporenvorläufer von sehr unterschiedlicher Gestalt und Größe (Abb 3.10).



**Abb. 3.10: Die Konidiophore der  $\Delta bem-1$  Mutante produzieren Makrokonidien von unregelmäßiger Form, welche im Vergleich zum Wildtyp deutlich mehr Kerne enthalten. A-D,** Konidiophore von Wildtyp (A) und  $\Delta bem-1$  Mutante (B-D). Sowohl Wildtyp als auch  $\Delta bem-1$  Mutante exprimieren H1-GFP zum Detektieren der Zellkerne (grün). Die Konidiophore beider Stämme wurden zur Sichtbarmachung der Zellwände und Septen mit *Calcofluor white* angefärbt (in Falschfarbe rot dargestellt), Größenbalken = 5  $\mu m$ . **E,** Häufigkeitsverteilung der Anzahl der Zellkerne pro Spore; je  $n = 157$  für Wildtyp und  $\Delta bem-1$ , Numerische Angaben zur Häufigkeitsverteilung siehe Anhang, Tab. 5.9; verwendete Stämme für Aufnahmen A-D und Quantifizierung in E: WT-HG und 2-HG ( $\Delta bem-1$ ).

Eine Quantifizierung der Anzahl der Zellkernen pro Spore zeigte, dass der Großteil der  $\Delta bem-1$  Sporen sieben und mehr Kerne enthält, während der Großteil der Wildtyp-Sporen lediglich ein bis sechs Kerne enthält (Abb 3.10, B).

### 3.3.5 Die Anzahl der $\Delta bem-1$ Keimlinge mit mehr als einem Keimschlauch ist vergleichbar mit der des Wildtyps

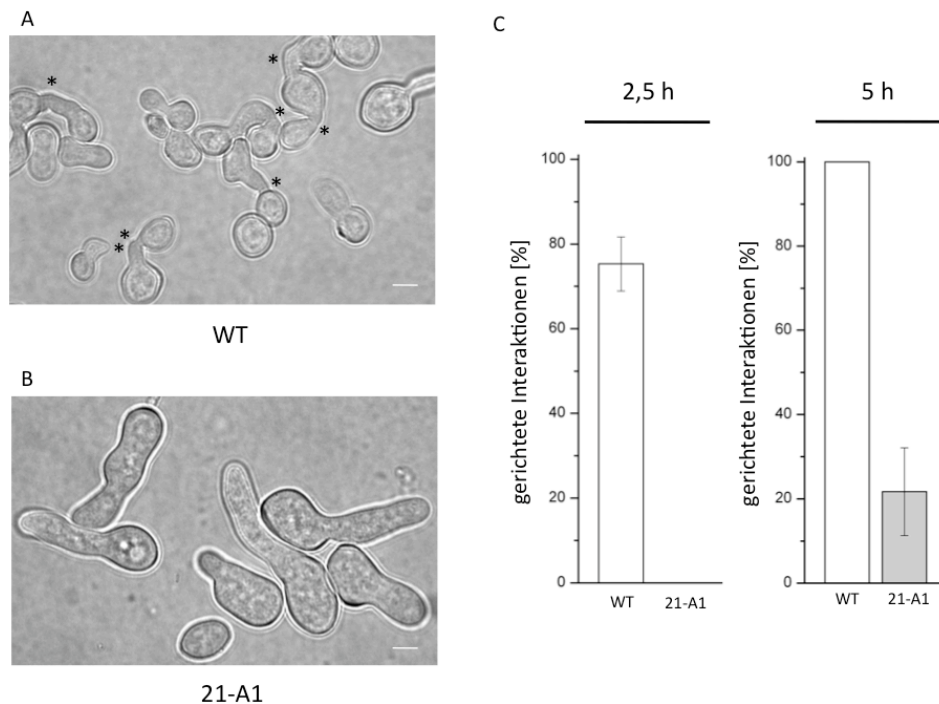
Die bisherigen Untersuchungen zeigten, dass *bem-1* in *N. crassa* zwar keinen Effekt auf die Polarität der reifen Hyphen zu haben scheint, jedoch maßgeblich an der Bildung der Makrokonidien beteiligt ist. Ein weiterer Prozess, bei welchem die Zellpolarität streng kontrolliert wird, ist die Ausbildung eines oder mehrerer Keimschläuche während der Sporenkeimung. Die Konidiosporen von *N. crassa* bilden in der Regel genau einen Keimschlauch aus (Seale, 1973). Bei der Sporenkeimung wird demnach eine einzige Polaritätsachse definiert, während die Ausbildung weiterer Polaritätsachsen unterdrückt wird. Um zu testen, ob BEM-1 hierbei eine Rolle spielt, wurde die Anzahl der Keimschläuche pro Spore bestimmt. Die  $\Delta bem-1$  Mutante 21-A1 zeigte hier jedoch keinen Unterschied zum Wildtyp. Lediglich



$1,3 \pm 2,3$  % der  $\Delta bem-1$  Sporen ( $n =$  drei mal 50 gekeimte Sporen) bildeten nach 2,5 Stunden bei 30°C auf Minimalmedium-Agar mehr als einen Keimschlauch aus. In den Wildtyp-Kontrollexperimenten mit Sporen des Stammes N1-06 taten dies durchschnittlich  $1,3 \pm 1,2$  % der Sporen. Diese Ergebnisse zeigen, dass der fein orchestrierte Prozess der Festlegung auf eine Polaritätsachse während der Keimung der Konidiosporen demnach in *N. crassa* von BEM-1 unbeeinflusst zu sein scheint.

### **3.3.6 Die gerichteten Interaktionen der $\Delta bem-1$ Keimlinge sind stark eingeschränkt**

Zur Klärung der im Fokus dieser Arbeit stehenden Frage, ob das Protein BEM-1 einen Einfluss auf die interzelluläre Kommunikation während der Zellfusion in *N. crassa* hat (Abschnitt 1.4), wurde die Rate der gerichtet interagierenden Konidiosporen-Keimlinge bestimmt (M&M, Abschnitt 2.7). In den Wildtyp-Kontrollexperimenten befanden sich nach 2,5 h Inkubation bei 30°C durchschnittlich 75 % der Keimlinge in gerichteten Interaktionen. Im Gegensatz dazu konnten zum gleichen Zeitpunkt keine Interaktionen zwischen den Keimlingen der  $\Delta bem-1$  Mutante gefunden werden. Die Keimlinge der Mutante schienen sich zu ignorieren und mit mehr oder weniger geraden Keimschläuchen auszuwachsen. Die beobachteten Zell-Zell-Kontakte wurden ausnahmslos als zufällig bewertet (Abb. 3.11).



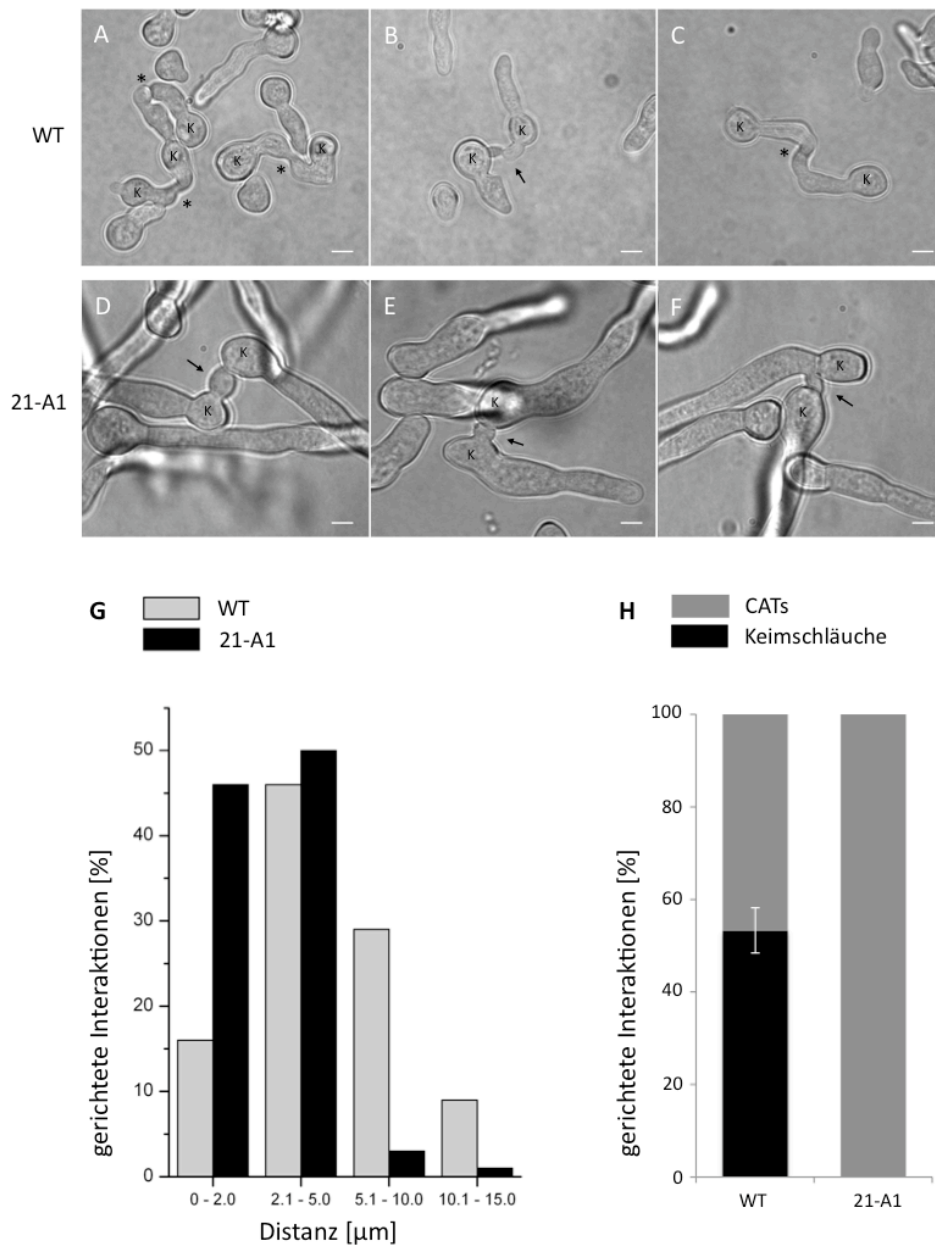
**Abb. 3.11: Die Keimlinge der  $\Delta bem-1$  Mutante zeigen verzögerte und stark reduzierte gerichtete Interaktionen.** A+B, Nomarski-Aufnahmen von Keimlingen des Wildtyps N1-06 und der  $\Delta bem-1$  Mutante 21-A1 nach 2,5 h Inkubation bei 30°C auf MM; Sternchen markieren gerichtete Interaktionen; Größenbalken = 5  $\mu$ m; C, Anzahl der Keimlinge, welche aufeinander zugerichtetes Wachstum zeigen. Es wurden je 3 x 50 Keimlinge nach 2,5 h bzw. 5 h Inkubation bei 30°C begutachtet; Fehlerbalken repräsentieren Standardabweichung; Stämme: Wildtyp N1-06 und  $\Delta bem-1$ -21-A1; numerische Angaben siehe Anhang, Tabellen 5.11 und 5.12.

Durch Komplementation mit funktionalem *bem-1* konnte dieser Defekt vollständig aufgehoben werden. 74 % der Keimlinge des Stammes 2208 befanden sich nach 2,5 h bei 30°C in gerichteten Interaktionen.

Nach einer fünf-stündigen Inkubation bei 30°C zeigten 100 % der Wildtyp-Keimlinge gerichtete Interaktionen. Zu diesem Zeitpunkt ließen sich auch zwischen den Keimlingen der  $\Delta bem-1$  Mutante solche Interaktionen erkennen. Der Anteil der  $\Delta bem-1$  Keimlinge, welche gerichtetes Wachstum zeigten, war jedoch im Vergleich zum Wildtyp mit knapp 22 % deutlich reduziert (Abb 3.11, C).

Eine Quantifizierung der Interaktionsrate zu einem späteren Zeitpunkt war nicht mehr möglich, da sich das gebildete Myzel bereits zu stark verdichtet hatte und die feinen Strukturen der gerichtet wachsenden Keimlinge meist nur noch schwerlich oder gar nicht mehr zu erkennen waren.

Bei Betrachtung der gerichtet wachsenden  $\Delta bem-1$  Keimlinge fiel auf, dass diese lediglich über kurze Distanzen miteinander in Wechselwirkung traten. Zudem erweckten sie den Eindruck, ausschließlich über CATs (EL, Abschnitt 1.2.1) zu interagieren. Im Gegensatz zum Wildtyp waren die  $\Delta bem-1$  Keimschläuche nie an einer Interaktion des gerichteten Wachstums beteiligt (Abb 3.12, A-F).

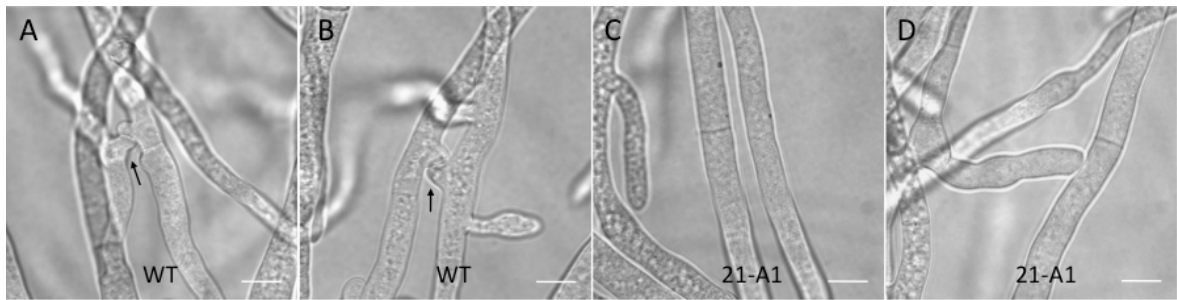


**Abb. 3.12: Die Keimlinge der  $\Delta bem-1$  Mutante interagieren über CATs, nicht jedoch über gerichtet wachsende Keimschlauchspitzen und überbrücken weniger häufig größere Distanzen.** **A-F**, Nomarski-Aufnahmen von Keimlingen des Wildtyps N1-06 (A-C) und der  $\Delta bem-1$  Mutante 21-A1 (D-F). Der Wildtyp wurde 2,5 h bei 30°C auf MM inkubiert, während die Keimlinge der  $\Delta bem-1$  Mutante 5 h inkubiert wurden; K, Konidien interagierender Keimlinge; Sternchen, Interaktionen zwischen gerichtet wachsenden Keimschlauchspitzen; Pfeile, Interaktionen zwischen CATs; Größenbalken = 5  $\mu m$ . **G**, Häufigkeitsverteilung der gerichteten Keimlingsinteraktionen bezogen auf die überbrückte Distanz; zur Quantifizierung wurden je 100 gerichtete Interaktionen von  $\Delta bem-1$ -21-A1 und Wildtyp N1-06 begutachtet. Numerische Angaben siehe Anhang, Tab. 5.13. **H**, Prozentuale Anteile der Keimschlauchspitzen-Interaktionen und die der CAT-Interaktionen gemessen an der Gesamtzahl der Interaktionen nach 5 h Inkubation bei 30°C; Fehlerbalken repräsentieren Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten; numerische Angaben siehe Anhang, Tab. 5.14.

Quantifizierungen ergaben, dass in 38 % der Interaktionen zwischen Wildtyp-Keimlingen eine Distanz von mehr als 5  $\mu\text{m}$  überbrückt wurde, während dies nur in 4 % der Interaktionen zwischen  $\Delta bem-1$  Keimlingen der Fall war (Abb 3.12, G). Die Interaktionen zwischen Wildtyp-Keimlingen zeigten in 53 % der Fälle die Beteiligung von mindestens einem gerichtet wachsenden Keimschlauch. In 47 % der Fälle wurde das Fusionsereignis dementsprechend ausschließlich durch CATs vermittelt. Die  $\Delta bem-1$  Keimlinge interagierten hingegen zu 100 % über CATs, während die Keimschläuche unbeteiligt waren (Abb 3.12, H). Demnach ist  $\Delta bem-1$  die erste Mutante, die während der Keimlingsfusion zwar mithilfe ihrer CATs gerichtet wachsen kann, nicht jedoch mithilfe ihrer Keimschläuche.

### 3.3.7 Die $\Delta bem-1$ Mutante zeigt Defekte in der Fusion vegetativer Hyphen

Alle bisher bekannten *N. crassa* Mutanten mit Defekten in der Keimlingsfusion wiesen gleichzeitig Defekte in der Fusion vegetativer Hyphen auf. Diese Beobachtung lässt vermuten, dass beiden Prozessen gleiche oder zumindest ähnliche Mechanismen zugrunde liegen (Fleissner *et al.*, 2008). Zur Beantwortung der Frage, ob die  $\Delta bem-1$  Mutante dem Muster der bereits bekannten Fusionsmutanten entspricht, wurden die reifen vegetativen Hyphen des subperipheren Bereichs der  $\Delta bem-1$  Kolonie auf Fusionen hin untersucht. Während beim Wildtyp zahlreiche Fusionen entdeckt werden konnten, war dies bei der  $\Delta bem-1$  Mutante nicht der Fall. Kontakte zwischen Hyphenspitzen von querverzweigten Hyphenabschnitten mit in Längsrichtung wachsenden Hyphen wurden ausnahmslos als zufällige Berührungen bewertet. Abbildung 3.13 zeigt exemplarisch Beispiele für Hyphenfusionen im Wildtyp sowie Aufnahmen vergleichbarer Bereiche in der  $\Delta bem-1$  Kolonie.



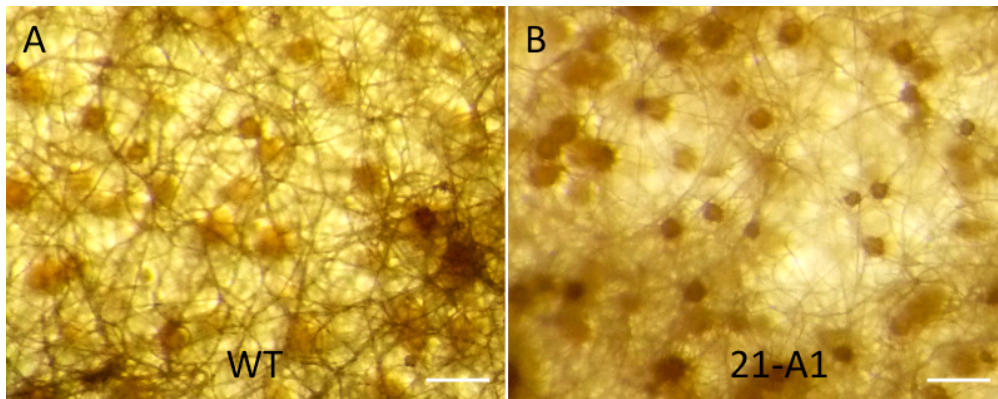
**Abb. 3.13: Die vegetativen Hyphen einer reifen  $\Delta bem-1$  Kolonie zeigen keine Fusionen.** A+B, Nomarski-Aufnahmen von Fusionen vegetativer Hyphen des Wildtyps N1-06, Pfeile markieren die Fusionsstellen; C+D, Nomarski-Aufnahmen vergleichbarer Bereiche in der  $\Delta bem-1$  Kolonie (Stamm 21-A1); Größenbalken = 10  $\mu$ m.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass BEM-1 nicht nur für die Keimlingsfusion (vgl. Abschnitt 3.3.6), sondern auch für die Fusion von vegetativen Hyphen in einer reifen Kolonie ein bedeutender Faktor ist. BEM-1 gehört somit offensichtlich zu dem molekularen Kernmodul, welches für beide Prozesse eine wesentliche Rolle spielt.

### 3.3.8 Das gerichtete Wachstum der $\Delta bem-1$ Trichogynen während der sexuellen Phase ist nicht beeinträchtigt

Wie in den vorherigen Kapiteln bereits beschrieben wurde, zeigte die  $\Delta bem-1$  Mutante deutliche Defekte bezüglich der gerichteten Interaktionen während der vegetativen Keimlings- und Hyphenfusion. Dies führte zu der Frage, ob BEM-1 möglicherweise Teil einer universellen Maschinerie ist, welche bei jeder Art der Polarisierung des Wachstums in Richtung externer Reize benötigt wird. Um diese Frage zu beantworten, wurde die Ausrichtung des Wachstum der weiblichen Befruchtungshyphe (Trichogyne) auf die Partnerzelle des entgegengesetzten Paarungstyps während der sexuellen Reproduktion untersucht (vgl. EL, Abschnitt 1.2 und M&M, Abschnitt 2.8).

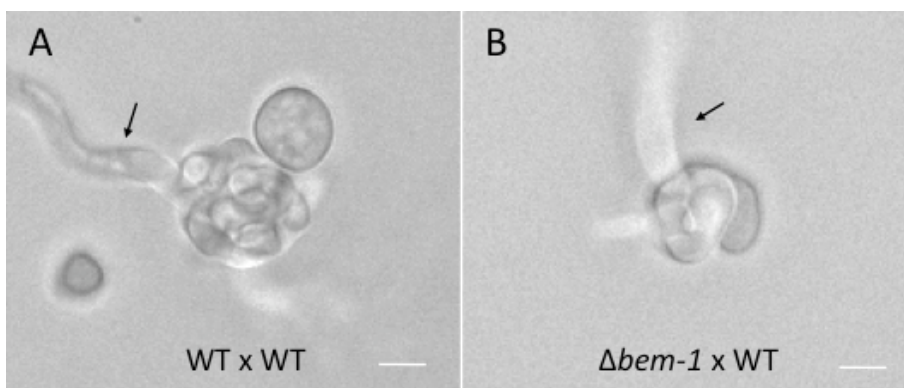
Der erste Schritt in der sexuellen Entwicklung von *N. crassa* ist die Ausbildung der weiblichen Fruchtkörper, den so genannten Protoperithezien (Raju, 2009). Dieser Entwicklungsschritt schien in der  $\Delta bem-1$  Mutante nicht betroffen zu sein, da die Mutante verglichen mit dem Wildtyp ebenso in der Lage war, Protoperithezien in vergleichbarer Anzahl, Größe und äußerer Form zu bilden (Abb. 3.14).



**Abb. 3.14: Die  $\Delta bem-1$  Mutante zeigte keine Defekte in der Bildung von Protoperithezien.** Stereomikroskopische Aufnahmen von Wildtyp N1-06 (A) und  $\Delta bem-1$ -21-A1 (B) auf Westergaard's Medium, 12 dpi. Protoperithezien sind als ca. 100 µm große, rundliche Strukturen zu erkennen. Größenbalken = 200 µm.

Die Protoperithezien von *N. crassa* bilden während ihrer Entwicklung spezielle weibliche Befruchtungshyphen aus, welche Trichogynen genannt werden (vgl. EL, Abschnitt 1.2). Sobald die Trichogynen in die Nähe von Sporen oder Keimlingen des entgegengesetzten Paarungstyps gelangen, wachsen sie chemotrop auf diese zu, um mit diesen zu fusionieren.

In einem so genannten Trichogynen-Assay zeigte sich, dass die  $\Delta bem-1$  Trichogynen in ihrer Fähigkeit chemotrop zu wachsen nicht eingeschränkt zu sein schienen (vgl. M&M, Abschnitt 2.8). Chemotrop wachsende  $\Delta bem-1$  Trichogynen konnten ebenso leicht gefunden werden, wie Trichogynen des Wildtyps in den entsprechenden Kontrollexperimenten. Die Art des chemotropen Wachstums der  $\Delta bem-1$  Trichogynen wies keine Abnormalitäten auf (Abb. 3.15).



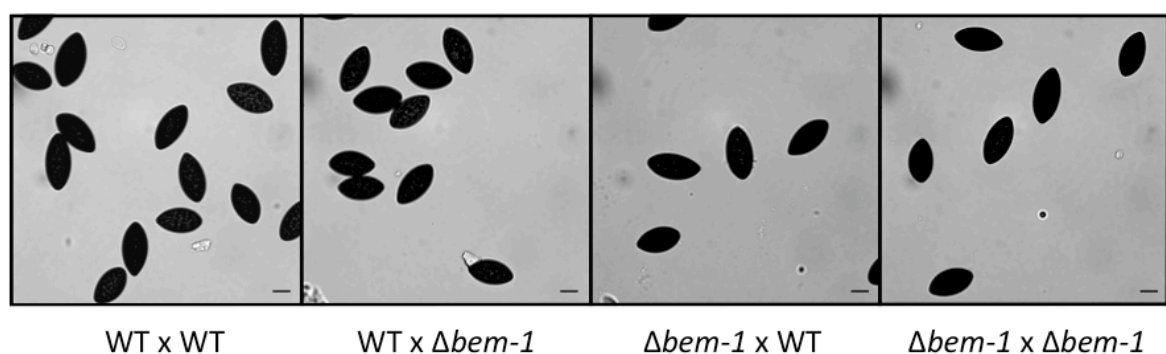
**Abb. 3.15: Die  $\Delta bem-1$  Trichogynen sind in ihrem gerichtetem Wachstum nicht gestört.** Abbildung A zeigt eine gerichtet gewachsenen Wildtyp-Trichogyne (N1-06), welche sich um eine Wildtyp-Spore (N1-01) gewickelt hat. Abbildung B zeigt eine gerichtet gewachsene  $\Delta bem-1$ -Trichogyne (21-A1), welche sich um eine Wildtyp-Spore (N1-01) gewickelt hat. Pfeile markieren jeweils den gerichtet gewachsenen Teil der Trichogynen; Größenbalken = 5 µm



BEM-1 scheint somit keinen Einfluss auf das gerichtete Wachstum der Trichogynen während der sexuellen Reproduktion zu haben. Folglich wird BEM-1 nicht generell für die Ausrichtung des Wachstums auf externe Reize benötigt.

### 3.3.9 BEM-1 ist essentiell für die Produktion von keimungsfähigen Ascosporen

Die Entwicklung der befruchteten Protoperithezien zu reifen Perithezien ist in der Keimlingsfusionsmutante  $\Delta so$  defekt. Um zu überprüfen, ob die  $\Delta bem-1$  Mutante in der Lage ist reife Perithezien und funktionsfähige Asci auszubilden, wurden zwei heterozygote Kreuzungen angesetzt. Hierbei wurde die  $\Delta bem-1$  Mutante einmal als weiblicher Kreuzungspartner (21-A1 x N1-01) und ein anderes Mal als männlicher Partner eingesetzt (N1-01 x 21-A1). Zudem wurde eine homozygote Kreuzung untersucht, bei welcher die  $\Delta bem-1$  Mutante zugleich als weiblicher und männlicher Kreuzungspartner verwendet wurde (21-A1 x 2-A1). Als Kontrolle diente eine Kreuzung zwischen den beiden Wildtyp-Stämmen N1-01 (♀) und N1-02 (♂). Alle Kreuzungen bildeten innerhalb einer Woche nach Befruchtung melanierte, ausdifferenzierte Perithezien aus, welche vergleichbare Mengen an Ascosporen produzierten. Bei mikroskopischer Betrachtung der Ascosporen konnten äußerlich keine Unterschiede in Bezug auf Form, Größe und Farbe festgestellt werden (Abb. 3.16).



**Abb. 3.16:** Die Ascosporen aus Kreuzungen mit der  $\Delta bem-1$  Mutante waren äußerlich nicht unterscheidbar von denen einer Wildtyp-Kontrollkreuzung. Vewendete Stämme siehe Text; Größenbalken = 10  $\mu m$ .

BEM-1 ist folglich nicht für die Ausbildung reifer Perithezien und Asci notwendig. Dieses Ergebnis zeigt auch, dass Zell-Zell-Fusion zwischen der Trichogyne und der



Spore des entgegengesetzten Paarungstyps stattgefunden hat. BEM-1 übernimmt bei diesem Prozess in *N. crassa* somit weder im weiblichen noch im männlichen Partner eine essentielle Funktion.

Obwohl die Ascosporen aus den  $\Delta bem-1$ -Kreuzungen äußerlich nicht von denen der Wildtyp-Kontrollkreuzung unterschieden werden konnten, zeigten sie einen starken Defekt in ihrer Keimungsfähigkeit. So waren nur rund die Hälfte der Ascosporen aus den heterozygoten Kreuzungen in der Lage zu keimen. Der Großteil der sich aus den gekeimten Ascosporen gebildeten Stämme zeigte ein Myzel mit Wildtyp-artigem Phänotyp und war sensitiv gegenüber Hygromycin. Lediglich 1-2% der gekeimten Ascosporen bildeten hygromycinresistente Stämme mit makroskopischem  $\Delta bem-1$ -Phänotyp aus (21-A1 x Wildtyp, 1%, n = 100 und Wildtyp x 21-A1, 2%, n = 100). In einer homozygoten Kreuzung (21-A1 x 2-A1) keimten weniger als 0,2% der Ascosporen aus (n > 1500). Die gekeimten Ascosporen dieser Kreuzung bildeten ausschließlich hygromycinresistente Stämme mit makroskopischem  $\Delta bem-1$ -Phänotyp aus.

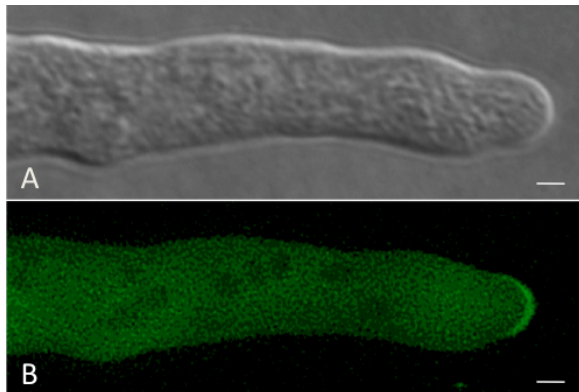
Diese Ergebnisse zeigen, dass BEM-1 in *N. crassa* zwar nicht für die Bildung der Ascosporen essentiell ist, allerdings einen erheblichen Einfluss auf deren Lebensfähigkeit hat. Der damit verbundene Phänotyp wird als Ascosporen-Lethalität bezeichnet.

### **3.4 Untersuchung der subzellulären Lokalisation und Dynamik von BEM-1-GFP in *N. crassa***

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die subzelluläre Lokalisation und Dynamik von BEM-1 in *N. crassa* zu untersuchen. Der Stamm 2208 (*Pccg-1-bem-1-gfp*;  $\Delta bem-1$ ) zeigte keine Unterschiede zum Wildtyp hinsichtlich der untersuchten phänotypischen Merkmale. Das *Pccg-1-bem-1-gfp* Konstrukt komplementierte demnach die Defekte der  $\Delta bem-1$  Mutante und wurde daher für die geplanten mikroskopischen Studien als geeignet befunden (vgl. Abb. 3.5, 3.6 und 3.9 sowie Abschnitt 3.3.6).

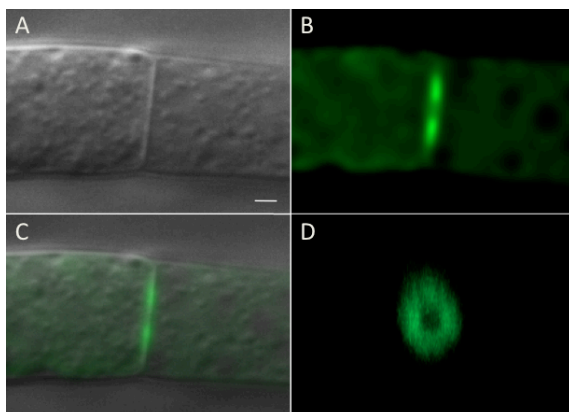
### 3.4.1 BEM-1-GFP lokalisiert an der Spitze von wachsenden Hyphen und an der Septenpore

Mittels fluoreszenzmikroskopischer Untersuchungen wurde BEM-1-GFP an der Spitze von wachsenden vegetativen Hyphen detektiert (Abb. 3.17). An den Spitzen von nicht wachsenden Hyphen war hingegen kein BEM-1-GFP sichtbar. BEM-1-GFP zeigte sich im Querschnitt der Hyphe als sichelförmige Proteinakkumulation, welche sich in subapikale Richtung ausdünnte.



**Abb. 3.17: BEM-1-GFP lokalisiert an der Spitze vegetativer Hyphen.** Der Stamm 2208 exprimiert das am C-terminus mit GFP fusionierte BEM-1 mithilfe des *ccg-1* Promotors; **A**, Nomarski-Aufnahme; **B**, Fluoreszenz-Aufnahme, deconvolierter Bilderstapel; Größenbalken = 2  $\mu\text{m}$ .

Mit deutlicher Signalstärke wurde BEM-1-GFP ebenso an der Septenpore gesunder vegetativer Hyphen detektiert. Eine 3D-Rekonstruktion veranschaulicht die Akkumulation von BEM-1-GFP um die Septenpore herum (Abb. 3.18).

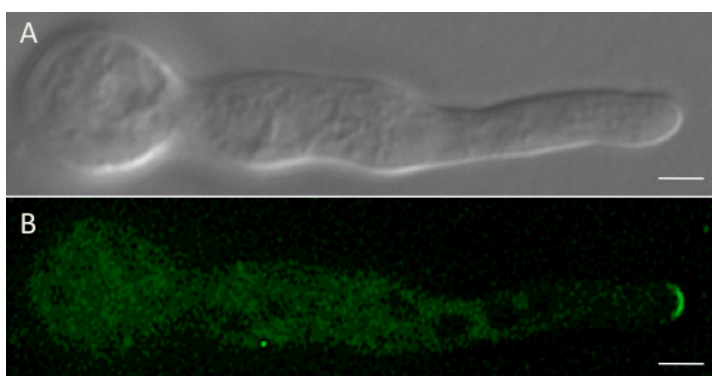


**Abb. 3.18: BEM-1-GFP lokalisiert an der Septenpore vegetativer Hyphen.** **A**, Nomarski-Aufnahme; **B**, Fluoreszenz-Aufnahme, deconvolierter Bilderstapel; **C**, A+B übereinander gelegt; **D**, 3D-Rekonstruktion von deconvoliertem Bilderstapel, Objekt um 90° horizontal gedreht; Stamm 2208; Größenbalken = 2  $\mu\text{m}$ .

Die Lokalisation von BEM-1-GFP am Septum deutete darauf hin, dass BEM-1 möglicherweise eine Rolle bei der Bildung der Septen spielt. In der  $\Delta bem-1$  Mutante konnte jedoch kein offensichtlicher Defekt bezüglich der Septierung festgestellt werden. Um einen möglichen leichten Defekt feststellen zu können, wurde der durchschnittliche Abstand zwischen den Septen bestimmt. Im Wildtyp N1-06 betrug dieser  $84,20 \pm 43,97 \mu\text{m}$ . Für die Mutante  $\Delta bem-1-21-A1$  wurde ein Wert von  $85,00 \pm 43,35 \mu\text{m}$  ermittelt. Beiden Messungen lag eine Stichprobengröße von  $n = 50$  zugrunde. Verglichen mit dem Wildtyp wies der durchschnittliche Abstand zwischen den Septen in der  $\Delta bem-1$  Mutante folglich keinen signifikanten Unterschied auf. BEM-1 scheint demnach nicht an der Bildung der Septen beteiligt zu sein.

#### 3.4.2 Unabhängig von der gerichteten Interaktion der Keimlinge lokalisiert BEM-1-GFP an der Spitze der Keimschläuche

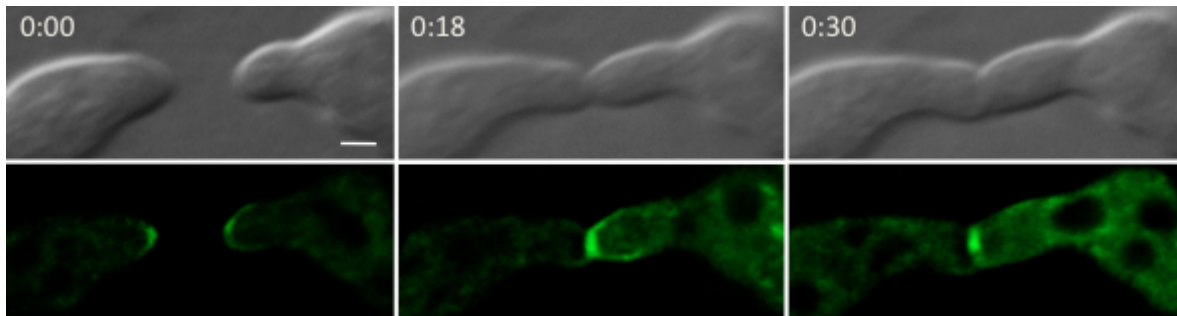
Vergleichbar mit der Lokalisierung in vegetativen Hyphen konnte BEM-1-GFP auch an den Spitzen der Keimschläuche von gekeimten Konidien detektiert werden. Ein BEM-1-GFP-Signal war auch hier nur an den Spitzen wachsender Keimschläuche sichtbar. BEM-1-GFP zeigte sich sowohl an den Keimschlauchspitzen von Keimlingen, die sich nicht in einer gerichteten Interaktion befanden (Abb. 3.19) als auch an den Keimschlauchspitzen der Keimlinge, die gerade dabei waren ihr Wachstum aufeinander auszurichten (Abb. 3.20).



**Abb. 3.19: BEM-1-GFP lokalisiert an der Spitze der Keimschläuche von nicht interagierenden Keimlingen.** A, Nomarski-Aufnahme; B, Fluoreszenz-Aufnahme, deconvolierter Bilderstapel; Stamm 2208; Größenbalken =  $2 \mu\text{m}$ .

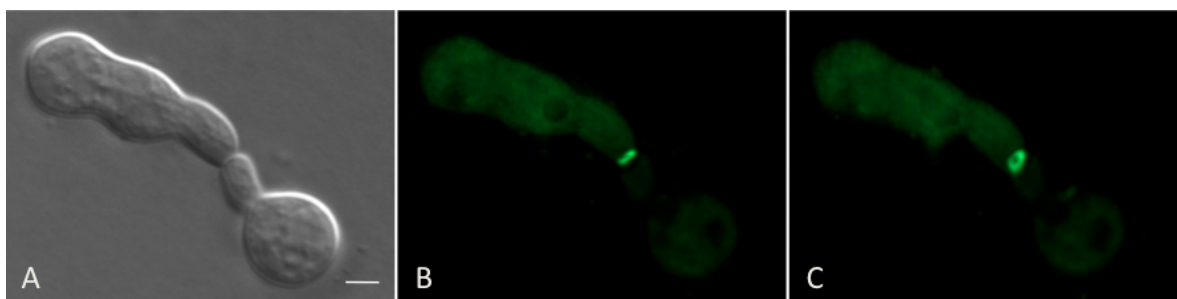
Während der gerichteten Interaktion befand sich BEM-1-GFP permanent an den Keimschlauchspitzen beider Partner. BEM-1 zeigt demnach keinen Wechsel zwischen

einem rekrutierten und einem delokalisierten Zustand, wie es für MAK-2 und SO beobachtet wurde. Nachdem die Keimschlauchspitzen der gerichtet aufeinander zu wachsenden Keimlinge einen primären Kontakt hergestellt hatten, konzentrierte sich BEM-1-GFP am gemeinsamen Kontaktpunkt (Abb. 3.20)



**Abb. 3.20: BEM-1-GFP lokalisiert an der Spitze der Keimschläuche von Keimlingen während der gerichteten Interaktion.** Zeitreihe von gerichtet aufeinander zuwachsenden und fusionierenden Keimschläuchen; **obere Reihe**, Nomarski-Aufnahmen; **untere Reihe**, Fluoreszenz-Aufnahmen, deconvolierte Bilderstapel; Stamm 2208; Zeit in h und min; Größenbalken = 2 µm.

Eine 3D-Rekonstruktion eines fusionierenden Keimlingspaares zeigte deutlich, dass BEM-1-GFP zu einem späteren Zeitpunkt um die sich öffnende Fusionspore herum lokalisierte (Abb. 3.21).



**Abb. 3.21: BEM-1-GFP lokalisiert während der Keimlingsfusion um die Fusionspore herum.** A, Nomarski-Aufnahme; B+C, 3D-Rekonstruktion von deconvolviertem Bilderstapel (Fluoreszenz-aufnahmen), Objekt in C leicht gedreht; Stamm 2208; Größenbalken = 2 µm.

Nach erfolgter Fusion blieb BEM-1-GFP noch eine Weile an der Fusionspore sichtbar, bis es schließlich verschwand. Dies geschah etwa 30 bis 40 min nachdem der Zell-Zell-Kontakt hergestellt wurde.

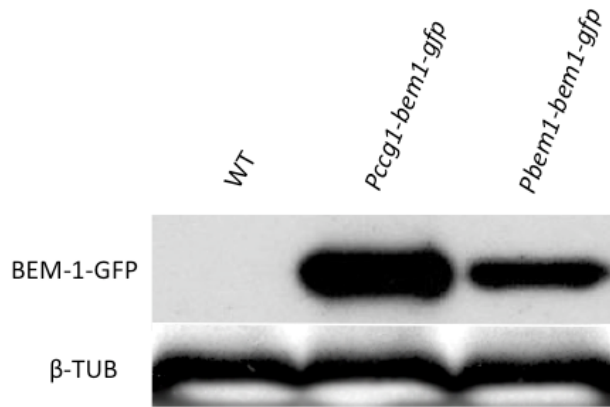
### 3.4.3 Untersuchung der subzellulären Lokalisation von BEM-1-GFP unter nativen Expressionsbedingungen

Die oben beschriebenen Studien zur subzellulären Lokalisation und Dynamik von BEM-1-GFP wurden mit dem Stamm 2208 durchgeführt. In diesem Stamm befindet

sich das BEM-1-GFP unter der Kontrolle des stark exprimierenden *ccg-1* Promotors, welcher bei Lokalisations-Studien in *N. crassa* üblicherweise verwendet wird (Freitag *et al.*, 2004). Um zu prüfen, ob die beobachteten Akkumulierungen von BEM-1-GFP an den beschriebenen subzellulären Stellen nicht auf Artefakten einer Überexpression beruhen, wurden die Lokalisation unter nativen Expressionsbedingungen untersucht. Hierzu wurde zunächst ein Stamm hergestellt, welcher BEM-1-GFP unter der Kontrolle des nativen *bem-1* Promotors exprimiert. Mit den Primern 71 und 234 wurde vorab der *bem-1* ORF zusammen mit 1054 bp stromaufwärts vom Startcodon mit Hilfe der PCR von genomischer DNA amplifiziert und mit *NotI* und *PacI* in den Vektor pMF272 kloniert. Der positive Klon pbem1-bem1-gfp-5 wurde daraufhin in die Histidin-auxotrophe  $\Delta$ *bem-1* Mutante 2-A1 transformiert. Die acht prototrophen Transformanten waren makroskopisch nicht vom Wildtyp unterscheidbar. Somit schien das *bem-1-gfp* Konstrukt mit dem nativen *bem-1* Promotor ebenso wie das Konstrukt mit dem *ccg-1* Promotor den Mutantenphänotyp zu komplementieren. Der Stamm Pbem1-bem1-gfp-5-1 wurde in drei Runden durch Einzelsporisolierung aufgereinigt, um möglicherweise vorhandene nicht transformierte Kerne des Ursprungs-Stammes zu eliminieren. Der aufgereinigte Stamm erhielt die Bezeichnung 2-BG.

Das *bem-1-gfp* Konstrukt mit dem nativen *bem-1* Promotor komplementierte ebenso wie das Konstrukt mit dem *ccg-1* Promotor den makroskopischen Phänotyp der  $\Delta$ *bem-1* Mutante, den Effekt der vergrößerten Konidien sowie den Defekt der Keimschläuche nicht mehr gerichtet interagieren zu können. Die durchschnittliche Größe der Konidien des Stammes 2-BG belief sich auf  $5,94 \mu\text{m} \pm 1,1$  ( $n = 50$ ; vgl. Abschnitt 3.3.4). Ein Beispiel von gerichtet interagierenden Keimschläuchen des Stammes 2-BG ist in Abbildung 3.23 (D) zu sehen.

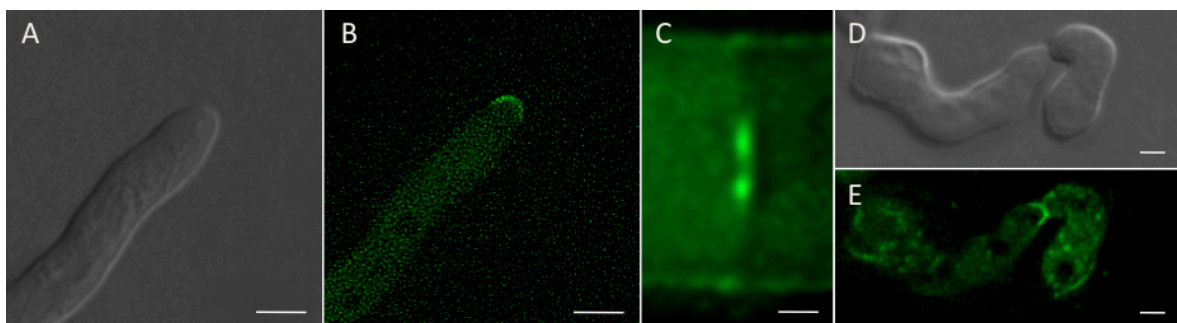
Die Expressionsstärke des nativen *bem-1* Promotors wurde mithilfe eines Western-Blots mit der des *ccg-1* Promotors verglichen. Der native *bem-1* Promotor führte im Vergleich zum *ccg-1* Promotor zu einer deutlich schwächeren Expression des BEM-1-GFPs (Abb. 3.22).



**Abb. 3.22: Western-Blot zur Überprüfung der Expressionsstärke des *bem-1* Promotors im Vergleich zum *ccg-1* Promotor.** Analysiert wurden Gesamtproteinextrakte der Stämme N1-03 (Wildtyp), 2208 (*Pccg-1-bem-1-gfp*) und 2-BG (*Pbem-1-bem-1-gfp*). BEM-1-GFP wurde mithilfe eines GFP-Antikörpers detektiert. Für die  $\beta$ -Tubulin Kontrollhybridisierung wurde der Antikörper TU27 verwendet (siehe M&M, Abschnitt 2.10.8).

Es zeigte sich somit, dass das BEM-1-GFP in dem Stamm 2208 durch den *ccg-1* Promotor deutlich überexprimiert wird. Der Stamm 2208 wies jedoch im Vergleich zum Wildtyp keine phänotypischen Defekte auf (vgl. Abschnitt 3.4). Demnach scheint die Überexpression von BEM-1-GFP keine schädlichen Auswirkungen auf die für die intakte Zellphysiologie notwendigen molekularen Wirkmechanismen zu haben.

Bei fluoreszenzmikroskopischer Betrachtung des Stammes 2-BG konnte BEM-1-GFP sowohl an der Hyphenspitze und an der Septenpore vegetativer reifer Hyphen als auch an der Spitze der Keimschläuche von Keimlingen detektiert werden (Abb. 3.23). Verglichen mit dem Stamm 2208 war die Signalstärke jedoch etwas geringer.

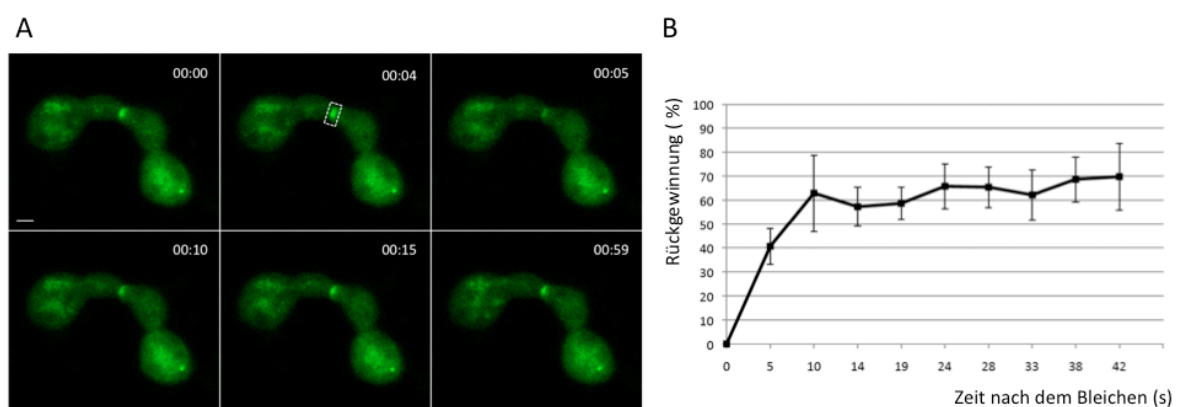


**Abb. 3.23: BEM-1-GFP lokalisiert auch unter nativen Expressionsbedingungen sowohl an der Hyphenspitze und Septenpore vegetativer Hyphen als auch an den Spitzen der Keimschläuche.** Der Stamm 2-BG exprimiert das am C-terminus mit GFP markierte BEM-1 mithilfe des nativen *bem-1* Promotors; **A+D**, Nomarski-Aufnahmen; **B, C+E**, Fluoreszenz-Aufnahmen, deconvolierte Bilderstapel; Größenbalken in A+B = 5  $\mu$ m; Größenbalken in C - E = 2  $\mu$ m.

Als wichtiges Ergebnis dieser Untersuchung lässt sich festhalten, dass die subzellulären Lokalisationen von BEM-1-GFP, welche bereits unter über-exprimierenden Bedingungen detektiert worden waren, nicht auf Artefakten beruhen, sondern auch unter nativen Expressionsbedingungen genau so zu finden sind.

#### 3.4.4 BEM-1-GFP wird während der Keimlingsfusion in einer hoch dynamischen Weise an den Fusionspunkt rekrutiert

Wie in Abschnitt 3.4.2 beschrieben, konzentriert sich BEM-1-GFP während der Keimlingsfusion nach erfolgtem Zell-Zell-Kontakt am Fusionspunkt. Dies führte zu der Frage, ob das detektierbare BEM-1-GFP am Fusionspunkt lediglich von übrig gebliebenem BEM-1-GFP stammt, welches bereits während der Phase des gerichteten Wachstums an die Keimlingsspitzen rekrutiert wurde oder ob es, nachdem der Zell-Zell-Kontakt hergestellt wurde, noch aktiv rekrutiert wird. Letzteres würde darauf hindeuten, dass BEM-1 nicht nur vor der Herstellung des Zell-Zell-Kontakts eine Funktion erfüllt sondern auch danach. Um diese Frage zu beantworten wurde ein so genanntes FRAP-Experiment durchgeführt (FRAP = *fluorescence recovery after photobleaching*, vgl. M&M, Abschnitt 2.6.4). Mit Hilfe eines konfokalen Laserscanning-Mikroskops (LSM) wurde mit einem Laser in einem schmalen Bereich um den Fusionspunkt herum das BEM-1-GFP gebleicht. In einer darauf folgenden Reihe von Aufnahmen, die in kleinstmöglichem Zeitabstand aufgenommen wurden, zeigte sich, dass innerhalb von Sekunden eine signifikante Menge an frischem BEM-1-GFP an den Fusionspunkt rekrutiert wurde (Abb. 3.24, A).



**Abb. 3.24: BEM-1-GFP wird während der Keimlingsfusion an den Fusionspunkt rekrutiert.** **A,** Zeitreihe eines FRAP-Experiments mit BEM-1-GFP exprimierenden Keimlingen während der Fusion; 4s nach Aufnahmestart wurde der markierte Bereich mittels eines Lasers gebleicht; Zeit in min und s; Stamm 2208; Größenbalken = 2  $\mu$ m. **B,** Graph zeigt prozentualen Anteil der am Fusionspunkt nach dem *Photobleaching* zurück gewonnenen BEM-1-GFP Fluoreszenz im zeitlichen Verlauf. Numerische Daten siehe Anhang, Tab. 5.21.

Innerhalb von nur 10s gewann das BEM-1-GFP-Signal an dem Fusionspunkt bereits 60% des durch *Photobleaching* eliminierten Fluoreszenzanteils zurück (Abb. 3.24, B).

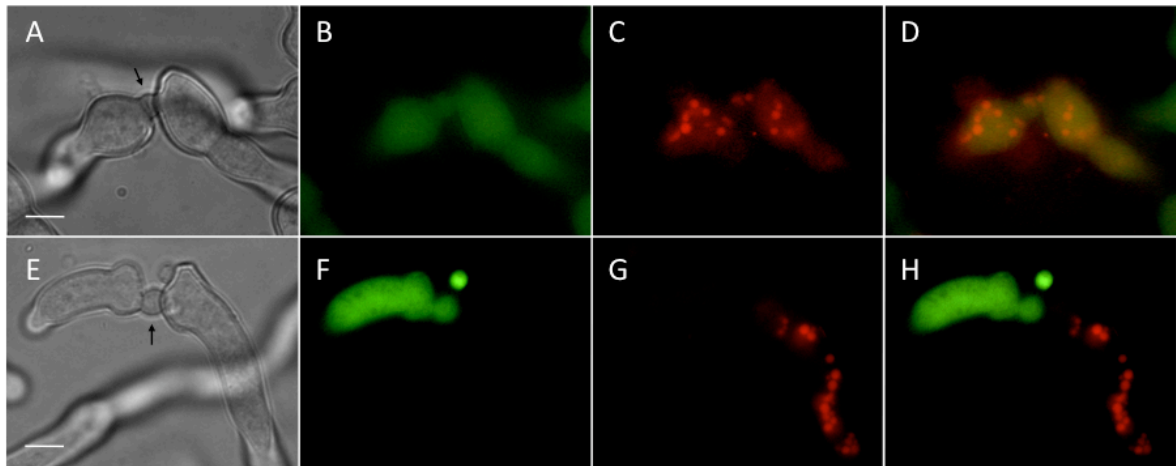
Diese Ergebnisse zeigen, dass BEM-1 auch dann noch rekrutiert wird, wenn die Herstellung des Zell-Zell-Kontakts bereits erfolgt ist. BEM-1 wird demnach nicht nur während der Phase des gerichteten Wachstums rekrutiert. Dies deutet darauf hin, dass es sowohl vor der Herstellung des Zell-Zell-Kontakts als auch danach eine Funktion übernimmt.

#### **3.4.5 Die Zell-Zell-Fusion während der Keimlingsinteraktionen ist in der *Δbem-1* Mutante nicht beeinträchtigt**

Die im vorherigen Abschnitt beschriebenen lokalisationskinetischen Untersuchungen ergaben, dass BEM-1-GFP in einer hoch dynamischen Weise an den Fusionspunkt rekrutiert wird. Eine detaillierte Untersuchung zur subzellulären Lokalisation zeigte bereits, dass BEM-1-GFP an der Fusionspore lokalisiert (Abschnitt 3.4.2). Diese Beobachtungen führten zu der Frage, ob BEM-1 eine Funktion bei der Zell-Zell-Fusion übernimmt. Diese Frage wurde mithilfe eines speziellen Fusions-Assays beantwortet, bei welchem Sporensuspensionen eines *gfp* exprimierenden Stammes mit denen eines *cherry red* exprimierenden Stammes zu gleichen Teilen gemischt und zusammen auf MM-Agar inkubiert wurden. Bilden zwei unterschiedlich gefärbte Zellen ein Fusionspaar, kommt es nach erfolgter Fusion zu einer Durchmischung der Zytoplasmen. Durch die damit verbundene Durchmischung der beiden Chromophore kann ein solches Ereignis eindeutig nachgewiesen werden. Zur Herstellung der entsprechenden *Δbem-1* Stämme wurden die Plasmide pMF272 (*gfp*) und pMFcherry-10 in den Empfängerstamm *Δbem-1-2-A1* transformiert. Die positiven Transformanten wurden über Einzelsporisolierung aufgereinigt, bevor die entsprechenden *Δbem-1* Stämme 2-G (*gfp*) und 2-C (*cherry red*) für den Fusions-Assay verwendet wurden. Eine Quantifizierung der Fusionsereignisse ergab, dass 92 % der *Δbem-1* Keimlingspaare, welche nach 5 h Inkubation bei 30°C Zell-Zell-Kontakt hergestellt hatten, erfolgreich fusioniert waren. Die Wildtyp-Paare fusionierten demgegenüber zu 94 %. Für das Wildtyp-Kontrollexperiment wurden die Stämme N3-06 (*gfp*) und N3-07 (*cherry red*) verwendet. In beiden Experimenten wurden je 50 Fusionspaare untersucht. In Abb. 3.25 ist exemplarisch je ein



fusioniertes und ein nicht fusioniertes Paar interagierender  $\Delta bem-1$  Keimlinge dargestellt.



**Abb. 3.25: Die Zell-Zell-Fusion während der Keimlingsfusion ist in der  $\Delta bem-1$  Mutante nicht beeinträchtigt.** A-D, erfolgreich fusioniertes  $\Delta bem-1$  Keimlingspaar; E-H, interagierendes  $\Delta bem-1$  Keimlingspaar mit Zell-Zell-Kontakt, welches nicht fusioniert ist; A+E, Nomarski-Aufnahmen, Pfeile markieren die Kontaktstellen beider Partner; B+F, GFP-Aufnahmen; C+G, *Cherry red* – Aufnahmen; D+H, GFP - und *Cherry red* – Aufnahmen übereinander gelegt; Größenbalken = 5  $\mu\text{m}$ .

Die oben aufgeführten Ergebnisse zeigen, dass BEM-1 während der späten Phase der Keimlingsfusionen in *N. crassa* keine essentielle Rolle bei der eigentlichen Zell-Zell-Fusion hat.

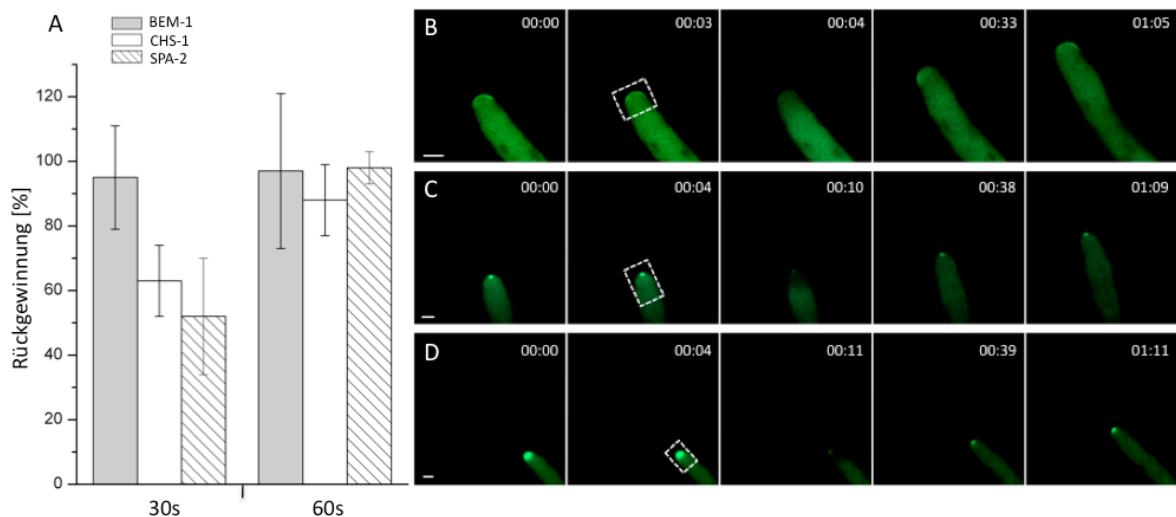
#### 3.4.6 Die Rekrutierung von BEM-1-GFP an die Hyphenspitze und die Septenpore erfolgt ebenso mit einer hohen Austausch-Dynamik

Analog zu der Austausch-Dynamik von BEM-1-GFP am Fusionspunkt von fusionierenden Keimlingen, wurde diese an der Hyphenspitze von reifen vegetativen Hyphen untersucht. In mehreren FRAP-Experimenten zeigte sich, dass das an der Spitze von wachsenden vegetativen Hyphen gebleichte BEM-1-GFP meist innerhalb von 20-30s annähernd vollständig durch frisches ungebleichtes BEM-1-GFP ausgetauscht wurde. Um eine genauere Vorstellung von Lokalisationskinetik an der Hyphenspitze zu bekommen, wurden FRAP-Experimente mit zwei Proteinen durchgeführt, die ebenfalls im Bereich der Hyphenspitze lokalisieren und als Referenzen dienen sollten. Zu diesem Zweck wurden die Proteine SPA-2 (Araujo-Palomares *et al.*, 2009) und CHS-1 (Sanchez-Leon *et al.*, 2011) ausgewählt. Aufgrund der von Jones & Sudbery an *C. albicans* durchgeführten FRAP-Studien (Jones &

Sudbery, 2010) wurde vermutet, dass die Polarisom-Komponente SPA-2 auch in *N. crassa* eine verhältnismäßig träge Austausch-Dynamik aufweisen sollte, wohingegen das Spitzenkörper-assoziierte Protein CHS-1 (Chitin-Synthase-1) eine recht hohe Dynamik zeigen sollte. Jones & Sudbery zeigten, dass die Spitzenkörper-assoziierten Proteine SEC-2 und SEC-4 in *C. albicans* im FRAP-Experiment nach 30s eine Erholungsrate zwischen 60-75 % aufwiesen, während sich die Erholungsrate von SPA-2 nach 30s auf weniger als 10 % belief (Jones & Sudbery, 2010). Über FRAP-Experimente mit *N. crassa*, bei welchen Proteine untersucht wurden, die sich an der Hyphenspitze befinden, gibt es bisher nur einen veröffentlichten Bericht. In dieser Arbeit zeigten Araujo-Palomares *et al.*, dass das an der Hyphenspitze befindliche SPA-2-GFP innerhalb von 12s nach dem Bleichen deutlich an Signalstärke zurück gewann. Allerdings wurden hierzu keine quantitativen Angaben gemacht (Araujo-Palomares *et al.*, 2009).

Der für die vorliegende Arbeit benutzte SPA-2-GFP exprimierende Stamm GN1-76 wurde von Ulrike Brandt hergestellt. Das zur Herstellung des CHS-1-GFP exprimierenden Stammes CG-12 benötigte Plasmid pESL-01-1 wurde freundlicher Weise von Meritzel Riquelme (CICESE, Ensenada, Mexiko) bereitgestellt.

Im FRAP-Experiment zeigte sich, dass die BEM-1-GFP Fluoreszenz an der Hyphenspitze bereits 30s nach dem Bleichen 95 % der Anfangsintensität zurück gewonnen hatte (Abb. 3.26) (vgl. M&M, Abschnitt 2.6.4). Für die Referenz-Proteine CHS-1 und SPA-2 hingegen wurde nach 30s eine Fluoreszenz-Rückgewinnungsrate zwischen 52-63 % gemessen. Im Vergleich zu den beiden Referenzproteinen schien BEM-1 demnach eine deutlich höhere Austausch-Dynamik an der Hyphenspitze zu zeigen. Bei einem Vergleich der Dynamiken von CHS-1 und SPA-2 untereinander konnte nach 30s allerdings kein Unterschied festgestellt werden. Nach 60s belief sich die Fluoreszenz-Rückgewinnungsrate auf 88 % für CHS-1-GFP und auf 98 % für SPA-2-GFP. Ein signifikanter Unterschied zu der von BEM-1-GFP (97 %) konnte zu diesem Zeitpunkt nicht mehr festgestellt werden.



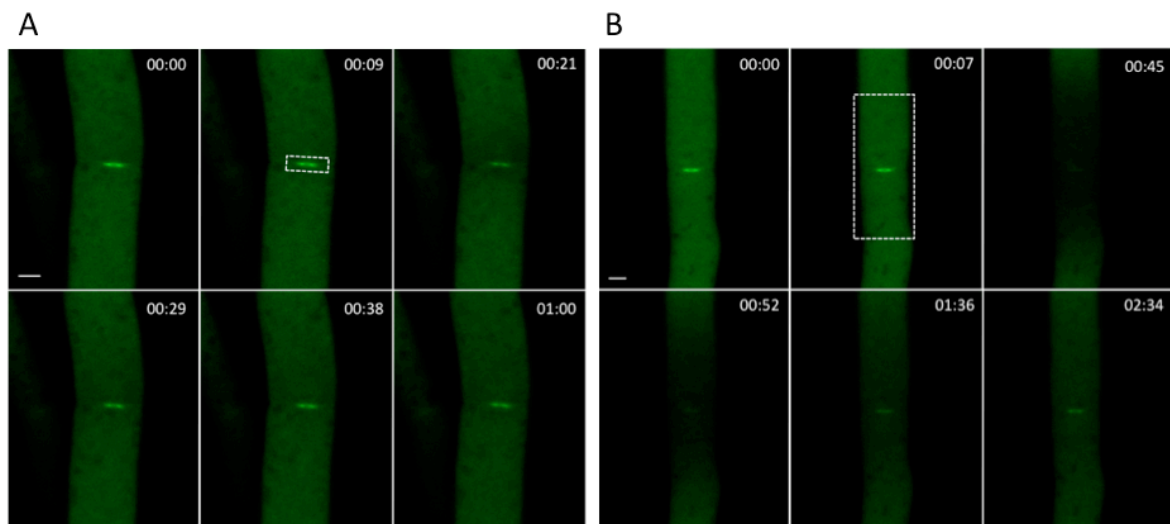
**Abb. 3.26: BEM-1-GFP zeigt eine hohe Austausch-Dynamik an der wachsenden Hyphenspitze.** **A**, Graph zeigt prozentualen Anteil der an der Hyphenspitze zurück gewonnenen Fluoreszenz von BEM-1-GFP, CHS-1-GFP und SPA-2-GFP 30s bzw. 60s nach *Photobleaching*. Numerische Daten siehe Anhang, Tab. 5.20. **B-C**, Zeitreihen von FRAP-Experimenten mit BEM-1-GFP (**B**), CHS-1-GFP (**C**) bzw. SPA-2-GFP (**D**) exprimierenden vegetativen Hyphen; 3-4s nach Aufnahmestart wurde der markierte Bereich mittels eines Lasers gebleicht; Zeit in min und s; Größenbalken = 5  $\mu$ m; verwendete Stämme: 2208 (BEM-1-GFP), CG-12 (CHS-1-GFP) und GN1-76 (SPA-2-GFP).

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass sich das in *N. crassa* an der Hyphenspitze befindliche BEM-1 in einem stetigen Austausch mit dem zytoplasmatischen BEM-1 befindet. Darüber hinaus zeigte sich, dass dieser Austausch im Vergleich zu dem des Spitzenkörper-Proteins CHS-1 und dem der Polarisom-Komponente SPA-2 durch eine stärkere Dynamik ausgezeichnet ist. Ein aufgrund der Daten der FRAP-Experimente in *C. albicans* (Jones & Sudbery, 2010) erwarteter Unterschied in der Austausch-Dynamik von SPA-2 und CHS-1 konnte nicht festgestellt werden.

Nach den Untersuchungen zur Lokalisationskinetik von BEM-1 am Fusionspunkt von fusionierenden Keimlingen (Abschnitt 3.4.4) und an der Spitze von reifen vegetativen Hyphen, wurde darüber hinaus die Austausch-Dynamik von BEM-1 an der Septenpore untersucht. Erste Versuche das BEM-1-GFP-Signal an der Septenpore vegetativer Hyphen zu bleichen scheiterten. Bei diesen Versuchen wurde während des Bleichvorgangs zunächst eine Laser-Intensität verwendet, die mit der der bereits beschriebenen FRAP-Experimente vergleichbar war. Auf diese Weise ließ sich das BEM-1-GFP-Signal an der Septenpore nicht in seiner Stärke reduzieren. Erst bei der Anwendung einer äußerst hohen Laser-Intensität in Kombination mit einer deutlichen Erhöhung der Anzahl der Wiederholungen des Scanvorgangs während des

Bleichens konnte eine leichte Minderung der Signal-Intensität erzielt werden (Abb. 3.27, A). Diese Ergebnisse führten zu der Vermutung, dass bereits während des Bleichvorgangs eine erhebliche Menge an gebleichtem BEM-1-GFP durch frisches ungebleichtes BEM-1-GFP aus dem Zytoplasma an der Septenpore ersetzt wird.

Aus diesem Grund wurde ein Experiment durchgeführt, bei welchem der durch den bleichenden Laser betroffene Bereich auf eine größere Fläche ausgedehnt wurde. Auf diese Weise wurde ein großer Teil des um die Septenpore herum im Zytoplasma befindlichen BEM-1-GFPs mit eingeschlossen. Durch diese Art des Bleichens konnte schließlich das BEM-1-GFP-Signal an der Septenpore stark reduziert werden (Abb. 3.27, B). Ein Wiederkehren des Signals an der Septenpore ging einher mit der Wiederkehr des zytoplasmatischen BEM-1-GFP-Signals.



**Abb. 3.27: BEM-1-GFP wird mit einer hohen Austausch-Dynamik an die Septenpore rekrutiert.** Zeitreihen zweier FRAP-Experimente mit BEM-1-GFP exprimierenden vegetativen Hyphen; 9s (A) bzw. 7s (B) nach Aufnahmestart wurde der markierte Bereich mittels eines Lasers gebleicht; Zeit in min und s; Stamm 2208; Größenbalken = 5  $\mu$ m.

Diese Ergebnisse zeigen, dass das an der Septenpore lokalisierende BEM-1 permanent mit einer hohen Dynamik durch im Zytoplasma befindliches BEM-1 ersetzt wird.

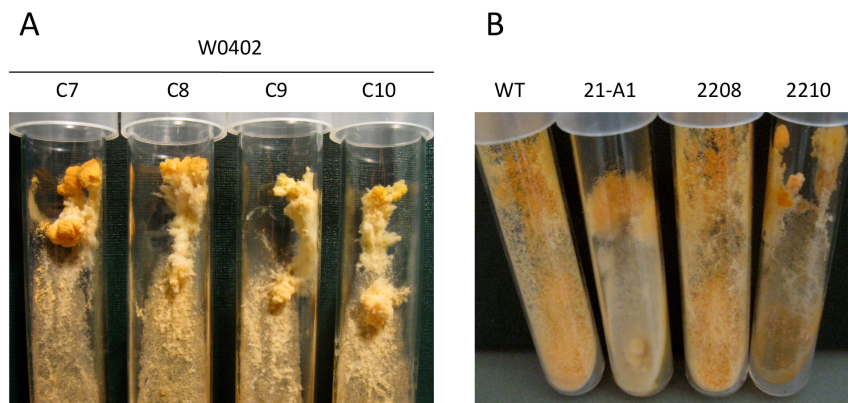
### 3.5 Ein N-terminal künstlich verlängertes BEM-1 hat einen dominant negativen Effekt auf die Zellpolarität

Zu Beginn dieser Arbeit wurde festgestellt, dass das *bem-1* Gen von *N. crassa* in den Datenbanken vom MIPS (<http://www.helmholtz-muenchen.de/>) und dem BROAD-Institut (<http://www.broadinstitute.org/>) auf unterschiedliche Weise annotiert war. Die Annotierung durch das MIPS schlug einen Translationsstart vor, welcher sich 141 bp vor dem der BROAD-Annotierung befand. Gemäß dieser Annotierung würde sich ein BEM-1-Protein mit einem um 47 Aminosäuren längeren N-terminus ergeben. Durch Sequenzierung des cDNA-Klons pbembait68 (vgl. Abschnitt 3.1) konnte die Transkription der 141 bp einschließlich des 5' gelegenen ATGs nachgewiesen werden. Für die zuvor beschriebenen BEM-1-Lokalisationsstudien wurde das kurze BEM-1 gemäß der BROAD-Annotierung verwendet. Aufgrund der bestehenden Unklarheit wurde zusätzlich das lange BEM-1 gemäß der Annotierung des MIPS untersucht. Die Klonierung der 141 bp längeren *bem-1* Sequenz wurde analog zur Klonierung der kurzen Sequenz durchgeführt (vgl. Abschnitt 3.2.3). Zu ihrer Amplifizierung wurden die Primer 10 und 11 verwendet. Der resultierende Vektor, welcher das durch den *ccg-1*-Promotor getriebene längere *bem-1-gfp* (LB) enthielt, wurde pbem1-gfp-W7 genannt. Wie bereits beschrieben, bewirkte die Expression des kurzen BEM-1-GFP keine makroskopischen Veränderungen (vgl. Abschnitt 3.4). Dies galt sowohl für das Konstrukt mit dem *ccg-1*-Promotor als auch für das mit dem nativen *bem-1*-Promotor, welches die zusätzlichen 141 bp der MIPS-Annotierung mit einschließt (vgl. Abschnitt 3.4.3). Anders jedoch nach Integration des LB-Konstrukts in den Wildtyp-Stamm N1-03 (Vektor pbem1-gfp-W7): hier zeichnete sich ein Großteil der Transformanten durch ein kompaktes Luftmyzel mit fontänenartiger Gestalt aus. Dieser Phänotyp deutete stark auf Defekte hin, die die Ausbildung und Aufrechterhaltung von Zellpolarität betreffen könnten. Zwei Transformanten aus dieser Transformation, Stamm W0103 und Stamm W0402 waren makroskopisch vom Wildtyp nicht zu unterscheiden. Der Stamm W0402 bildete jedoch nach Aufreinigung durch Vereinzelung von vegetativen Konidiosporen ebenfalls das fontänenartige Luftmyzel aus (Abb. 3.28, A; Stämme C7-C10).

Um zu prüfen, ob das LB-Konstrukt in der Lage ist, die Ascosporen-Lethalität der *Δbem-1* Mutante zu komplementieren, wurde der Stamm W0103 mit der Deletionsmutante 21-A1 gekreuzt. Da Nachkommen aus *N. crassa* - Kreuzungen in der

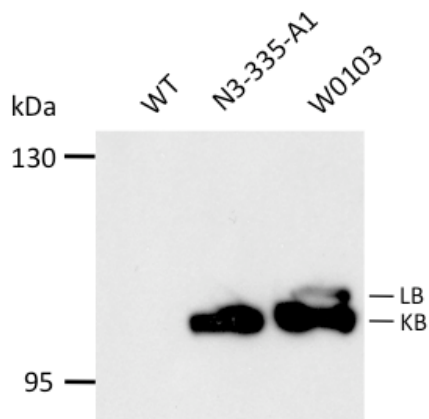
Regel homokaryotisch sind, werden darüber hinaus durch das Kreuzen alternativ zur Vereinzelung von Konidiosporen heterokaryotische Stämme aufgereinigt. Die Nachkommen wurden zunächst auf Hygromycinresistenz und damit auf Trägerschaft der *Abem-1* Deletion selektiert. Ascosporen, welche Träger der *Abem-1* Deletion sind und keine komplementierende *bem-1*-Sequenz am *his-3*-Locus aufweisen, sind in der Regel lethal und können nicht keimen (vgl. Abschnitt 3.3.9). Nahezu alle Nachkommen, welche die *Abem-1* Deletion trugen, zeigten ebenfalls das fontänenartige Luftmyzel (vgl. Abb. 3.28, B; Stamm 2210). Daher ist davon auszugehen, dass die lebensfähigen Nachkommen Träger der LB-Sequenz sind, welche die Ascosporen-Lethalität der *Abem-1* Deletion komplementiert und gleichzeitig die Morphologie des Luftmyzels verändert.

An dieser Stelle lässt sich somit zusammenfassend festhalten, dass die durch das MIPS annotierte lange *bem-1* Sequenz in Kombination mit dem *ccg-1* Promotor sowohl im Wildtyp als auch im *Abem-1* Hintergrund einen vergleichbaren dominant negativen Effekt auf den makroskopischen Phänotyp hat, welcher sich in einer starken Veränderung der Luftmyzelmorphologie äußert. Die lange *bem-1* Sequenz zeigte offensichtlich nur dann einen dominant negativen Effekt gegenüber dem Wildtyp-Allel, wenn sie in der Zelle im Verhältnis zum Wildtyp-Allel in ausreichend hoher Kopienzahl vorlag. Dieser Dosis-Effekt äußerte sich darin, dass die offensichtlich heterokaryotischen Stämme W0402 und W0103 vor der Aufreinigung einen Wildtyp-artigen Phänotyp aufwiesen, nach Aufreinigung als homokaryotische Stämme jedoch die gestörte Luftmyzelmorphologie zeigten.



**Abb. 3.28: Die vom MIPS annotierte lange *bem-1* Sequenz führt in Kombination mit dem *ccg-1* Promotor zu einer fontänenartigen Luftmyzelmorphologie. A**, nach dreimaliger sequenzieller Einzelsporisolierung des Stammes W0402 zeigten alle Isolate (C7-C10) eine fontänenartige Luftmyzelmorphologie **B**, nach Aufreinigung des Stammes W0103 durch Kreuzung mit dem  $\Delta bem-1$  Stamm 21-A1 zeigte unter anderem der Stamm 2210 (langes *Pccg-1-bem-1-gfp*;  $\Delta bem-1$ ) das fontänenartige Luftmyzel; zum Vergleich Wildtyp-Stamm N1-06,  $\Delta bem-1$ -21-A1 und Komplementante 2208 (kurzes *Pccg-1-bem-1-gfp*;  $\Delta bem-1$ ); Stämme in A und B auf Minimalmedium in Schrägagarrröhrchen.

Um die Expression des langen BEM-1-GFP nachzuweisen, wurde eine Western-Blot Analyse mit dem Stamm W0103 durchgeführt. Hierfür wurde ein Antikörper gegen GFP verwendet. Als Kontrollen diente der Wildtyp-Stamm N1-03 sowie der Stamm N3-335-A1, welcher das kurze BEM-1-GFP exprimierte. Erstaunlicherweise zeigte sich, dass die LB-Sequenz hinter dem *ccg-1* Promotor zu einer starken Expression eines Produkts von der Größe des kurzen BEM-1-GFP führte, ein Produkt von der Größe des langen BEM-1-GFP jedoch nur schwach exprimiert wurde (Abb. 3.29).

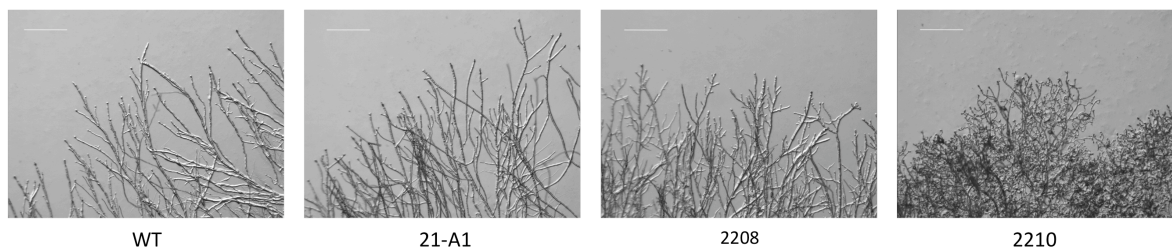


**Abb. 3.29: Western-Blot zur Überprüfung der Expression des kurzen und langen BEM-1-GFP Fusionsproteins unter der Kontrolle des *ccg-1* Promotors.** BEM-1-GFP wurde mithilfe eines GFP-Antikörpers detektiert. Bei den verwendeten Proben handelt es sich um Gesamtproteinextrakte. Stamm N3-335-A1 enthält das kurze *Pccg-1-bem-1-gfp* Konstrukt, W0103 enthält das 141 bp längere *Pccg-1-bem-1-gfp* Konstrukt. Das lange BEM-1-GFP (LB) ist als schwache Bande oberhalb der des kurzen BEM-1-GFPs (KB) zu erkennen (Stamm W0103). Der Unterschied zwischen dem kurzen und dem langen BEM-1-GFP beträgt 5,5 kDa. Als Negativkontrolle wurde der Wildtyp-Stamm N1-03 verwendet.

Wie bereits gezeigt, wird in Kombination mit dem nativen *bem-1* Promotor nur das kurze BEM-1-GFP exprimiert (vgl. Abb. 3.22). Das lange BEM-1-GFP ist demnach ein Artefakt, welches in Kombination mit dem *ccg-1* Promotor entsteht. Dennoch scheint interessanterweise trotz Verwendung des *ccg-1* Promotors bei der Translation der mRNA das 3' gelegene ATG gegenüber dem 5' gelegenen bevorzugt zu werden.

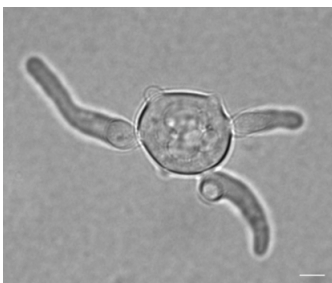
Die starke Veränderung des makroskopischen Phänotyps durch das lange BEM-1-GFP ließ es interessant erscheinen das radiale Koloniewachstum des Stammes 2210 zu untersuchen. Bei stereomikroskopischer Betrachtung des Kolonierandes zeigte sich, dass das Myzelwachstum deutlich gedrungener war und sich die Hyphen stärker zu verzweigen schienen, verglichen mit dem Wildtyp-Stamm N1-06, der  $\Delta bem-1$  Mutante 21-A1 und dem Stamm 2208, in welchem die  $\Delta bem-1$  Deletion durch funktionales *bem-1* komplementiert worden war (Abb. 3.30).





**Abb. 3.30:** Das lang BEM-1-GFP führt zu einer verstärkten Hyphenverzweigung und kompakterem Myzelwachstum. Stereomikroskopische Aufnahmen der Hyphenfronten von Wildtyp N1-06,  $\Delta bem-1$ -21-A1, komplementiertem Stamm 2208 (kurzes *Pccg-1-bem-1-gfp*) und 2210 (langes *Pccg-1-bem-1-gfp*;  $\Delta bem-1$ ) auf Minimalmedium-Agar; Größenbalken = 500  $\mu\text{m}$ .

Bei Begutachtung der keimenden Makrokonidien des Stammes 2210 zeigte sich, dass diese häufig 2-3 Keimschläuche bildeten. Während nur  $1,3 \pm 1,2 \%$  der Makrokonidien des Wildtyps mit mehr als einem Keimschlauch auskeimten (vgl. Abschnitt 3.3.5), bildeten  $53,5 \pm 2,6 \%$  der Makrokonidien des Stammes 2210 zwei oder mehr Keimschläuche aus. Ein Beispiel eines mit mehreren Keimschläuchen ausgekeimten Makrokonidiums ist in Abbildung 3.31 dargestellt.

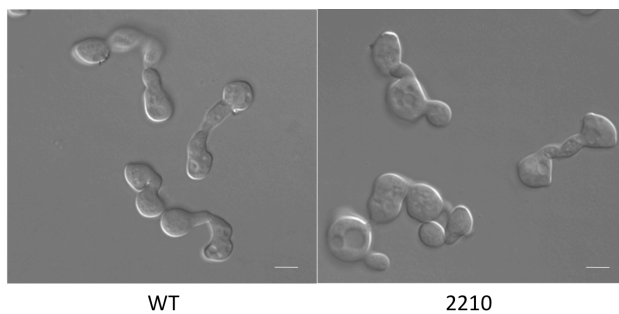


**Abb. 3.31:** Ausgekeimtes Makrokonidium des Stammes 2210 (langes *Pccg-1-bem-1-gfp*;  $\Delta bem-1$ ). Nomarski-Aufnahme nach 1,5 h Inkubation bei 30°C auf Minimalmedium-Agar. Größenbalken = 5  $\mu\text{m}$ .

Der dominant negative Effekt des langen BEM-1-GFP führt folglich nicht nur zu einer stärkeren Verzweigung der vegetativen Hyphen sondern darüber hinaus auch zur verstärkten Ausbildung mehrerer Polaritätsachsen während der Makrokonidien-Keimung. Es hat demnach einen signifikanten Einfluss auf die Ausbildung und Aufrechterhaltung der Zellpolarität.

Die Tendenz mit mehreren Keimschläuchen auszukeimen schien zudem mit der Größe der Makrokonidien zu korrelieren. Je größer die Makrokonidien waren, desto eher schienen sie mit mehreren Keimschläuchen auszukeimen. Die Sporen des Stammes 2210 hatten im Durchschnitt einen Durchmesser von  $8,3 \pm 1,9 \mu\text{m}$ . Der Defekt der großen  $\Delta\text{bem-1}$  Sporen wurde durch das LB-Konstrukt folglich nicht vollständig komplementiert (vgl. Abschnitt 3.3.4).

Trotz des starken Effekts auf die Zellpolarität eignete sich das LB-Konstrukt, den Defekt des gerichteten Wachstums der  $\Delta\text{bem-1}$  Keimschläuche während der Keimlingsfusion zu komplementieren (Abb. 3.32).

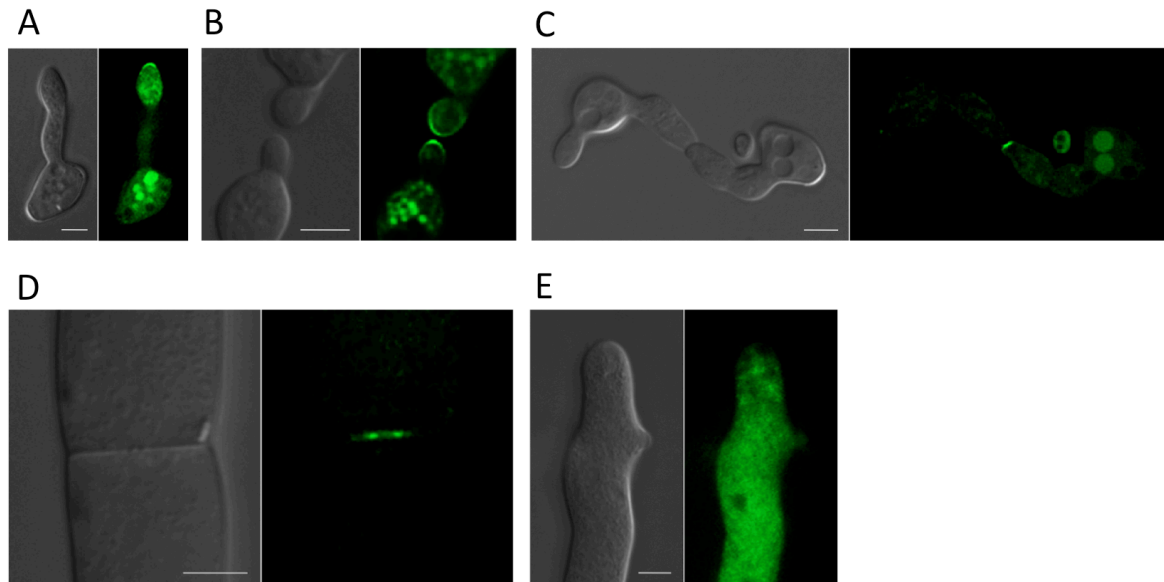


**Abb. 3.32: Das LB-Konstrukt komplementiert den Defekt der  $\Delta\text{bem-1}$  Keimschläuche im gerichteten Wachstum.** Nomarski-Aufnahmen von Keimlingen des Wildtyps N1-06 und des Stammes 2210 (langes *Pccg-1-bem-1-gfp*;  $\Delta\text{bem-1}$ ); 2,5 hpi; Größenbalken =  $5 \mu\text{m}$ .

Während  $75,3 \pm 6,4 \%$  der Keimlinge des Wildtyps und  $73,7 \pm 8,5 \%$  der Keimlinge des Stammes 2208 (kurzes *Pccg-1-bem-1-gfp*;  $\Delta\text{bem-1}$ ) nach 2,5 stündiger Inkubation bei  $30^\circ\text{C}$  miteinander fusionierten (vgl. Abschnitt 3.3.6), war dies nach der gleichen Zeit bei  $97,7 \pm 2,1 \%$  der Keimlinge des Stammes 2210 der Fall. Der hohe Prozentsatz der interagierenden Keimlinge des Stammes 2210 lässt vermuten, dass das LB-Konstrukt die gerichteten Interaktionen möglicherweise sogar fördert.

Eine Quantifizierung der prozentualen Beteiligung der Keimschlauchspitzen bzw. CATs an der Gesamtzahl der gerichteten Interaktionen wurde mit dem Stamm 2210 nicht durchgeführt, da das verstärkte Auskeimen mit mehreren Keimschläuchen die sichere Unterscheidung zwischen CATs und Keimschläuchen unmöglich machte.

Bei fluoreszenzmikroskopischer Betrachtung ließ sich BEM-1-GFP in Stamm 2210 (langes *Pccg-1-bem-1-gfp*;  $\Delta bem-1$ ) sowohl an den Keimlingsspitzen und am Fusionspunkt (Abb. 3.33, A-C) als auch am Septum von reifen Hyphen beobachten (Abb 3.33, D).



**Abb. 3.33: Der Stamm 2210 (LB-Konstrukt) zeigt die BEM-1-GFP spezifischen Lokalisierungen an der Keimschlauchspitze, am Fusionspunkt von fusionierenden Keimlingen und am Septum, jedoch nicht an der Spitze vegetativer Hyphen.** A-E, Nomarski-Aufnahme links und Fluoreszenzaufnahme rechts; **A**, nicht interagierender Keimling; **B**, Keimlinge während der gerichteten Interaktion; **C**, Keimlinge während der Keimschlauchfusion nach Kontaktherstellung; **D**, Abschnitt einer vegetativen Hyphe einschließlich Septum; **E**, Spitze einer reifen vegetativen Hyphe; Größenskalen = 5  $\mu$ m.

Ein BEM-1-GFP Signal an den Spitzen reifer Hyphen konnte in Stamm 2210 nicht detektiert werden (Abb. 3.33, E). In Stamm 2208 wurde das kurze BEM-1-GFP lediglich an den Spitzen von reifen Hyphen beobachtet, welche sich während der mikroskopischen Betrachtung durch deutlich wahrnehmbares Wachstum auszeichneten (Abb. 3.17). Eine solche Wachstumsgeschwindigkeit wurde bei keiner der untersuchten Hyphen des Stammes 2210 festgestellt. Somit ist das fehlende BEM-1-GFP Signal an den Spitzen reifer Hyphen des Stammes 2210 möglicherweise ein Sekundäreffekt der verminderten Wachstumsgeschwindigkeit.

Mittels Western-Blot Analyse wurde gezeigt, dass bei Vorhandensein des langen *Pccg-1-bem-1-gfp* Konstrukts sowohl das kurze als auch das lange BEM-1-GFP exprimiert wird. Dadurch bleibt an dieser Stelle ungeklärt, ob das in Stamm 2210 fluoreszenzmikroskopisch detektierte BEM-1-GFP nur aus der kurzen Proteinversion

oder aus beiden Varianten besteht. Abschließend lässt sich zusammenfassen, dass das am N-terminus um 47 Aminosäuren künstlich verlängerte BEM-1 zu deutlichen Veränderungen in der Lufthyphenmorphologie und zu Defekten in der Ausbildung und Aufrechterhaltung von Zellpolarität führt. Diese Beobachtung deutet stark darauf hin, dass BEM-1 in *N. crassa* mit Bestandteilen der Zellpolaritätsmaschinerie interagiert. Die gerichteten Keimschlauchinteraktionen sind durch das LB-Konstrukt jedoch nicht betroffen. Diese Tatsache könnte darauf hindeuten, dass BEM-1 hinsichtlich seiner Beteiligung an der Regulation genereller Zellpolarität sowie an der Ausrichtung der Keimschläuche auf den Fusionspartner mit unterschiedlichen Faktoren interagiert und möglicherweise in verschiedenen Proteinkomplexen seine Funktion erfüllt.

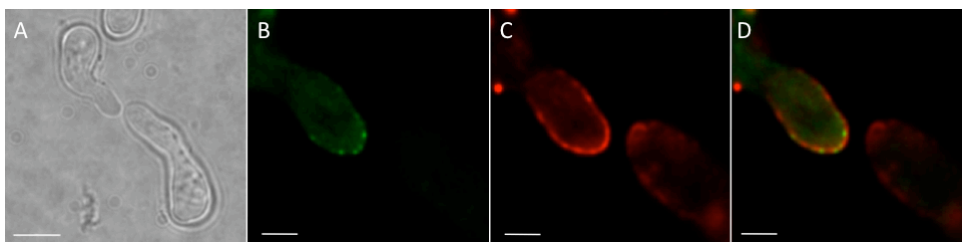
### **3.6 Untersuchung des Einflusses von BEM-1 auf die subzelluläre Dynamik von MAK-2 und SO**

Die gerichteten Interaktionen der  $\Delta bem-1$  Keimlinge sind stark eingeschränkt. Daher stellt sich die Frage, welche Funktion BEM-1 bei dieser speziellen Art der Ausrichtung des zellulären Wachstums übernimmt. Um sich der Antwort dieser Frage zu nähern, wurde zunächst die Beziehung von BEM-1 zu den Proteinen MAK-2 und SO untersucht, welche an den gerichtet wachsenden Keimlingsspitzen entgegengesetzt oszillieren (vgl. EL, Abschnitt 1.2.1).

#### **3.6.1 BEM-1 und MAK-2 kolokalisieren während der Keimlingsfusion nach Herstellung des Zell-Zell-Kontakts an der Fusionspore**

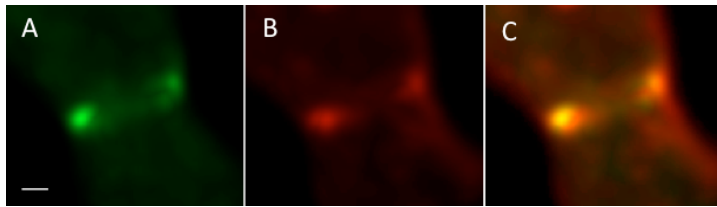
In *S. cerevisiae* übernimmt Bem1p während der Paarung von haploiden  $\alpha$ - und  $a$ -Zellen eine zentrale Aufgabe als Adapter für die Verknüpfung von Komponenten, welche für die intrazelluläre Signalweiterleitung eine essentielle Rolle spielen (Leeuw *et al.*, 1995, Lyons *et al.*, 1996). Über das Gerüstprotein Ste5p steht Bem1p in Verbindung mit der MAP Kinase Fus3p (MAK-2) (Bardwell, 2004, Leeuw *et al.*, 1995). Wenn BEM-1 in *N. crassa* eine ähnliche Adapter-Funktion übernimmt, dann sollten sich BEM-1 und MAK-2 in der lebenden Zelle, zumindest zeitweilig, in den gleichen molekularen Komplexen zeigen. Um dies zu prüfen, wurde eine Kolokalisierungsstudie mit beiden Proteinen durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde ein Stamm hergestellt, welcher sowohl dsRED-BEM-1 als auch MAK-2-GFP

exprimiert. Zur Herstellung eines dsRED-BEM-1-Fusionsproteins wurde der *bem-1* ORF mit den Primern 197 und 248 über *SpeI* und *XbaI* in das Plasmid pMF334 kloniert. Nach Transformation des  $\Delta$ *bem-1*-Stammes 2-A1 mit dem Plasmid pbem1-dsred-2 wurden mehrere Transformanten isoliert, welche das mit dsRED N-terminal markierte BEM-1 unter der Kontrolle des *ccg-1* Promotors exprimierten. Nach der Aufreinigung über Einzelsporisolierung wurde der Stamm 2-BR als ein Stamm mit einer starken dsRED-BEM-1 Expression identifiziert. Die Herstellung eines Stammes, welcher sowohl dsRED-BEM-1 als auch MAK-2-GFP exprimiert, erfolgte durch Heterokaryenbildung. Hierzu wurden Sporen-Suspensionen von 2-BR (dsRED-BEM-1) mit denen von N1-41 (MAK-2-GFP) in gleichem Verhältnis gemischt und auf Minimal-Medium-Agar inkubiert. Das Ergebnis der Fusion beider Stämme war der heterokaryotische Stamm BM-5, welcher beide Proteine gleichermaßen exprimiert. In mehreren Kolokalisierungs-Experimenten zeigte sich, dass dsRED-BEM-1 und MAK-2-GFP während der gerichteten Keimlingsinteraktionen nicht eindeutig miteinander kolokalisierten. Ein Beispiel ist in Abbildung 3.34 dargestellt. Während MAK-2-GFP in deutlich voneinander unterscheidbaren Punkten an den Keimlingsspitzen lokalisierte (Abb. 3.34, B), zeigte dsRED-BEM-1 dort zwar ein ähnliches Muster, jedoch waren die punktförmigen Proteinansammlungen stärker durch ein kontinuierliches in der Membran der Keimlingsspitzen befindliches Signal miteinander verbunden (Abb. 3.34, C). Ein Übereinanderlegen der roten und der grünen Fluoreszenzaufnahme zeigte ebenso deutlich, dass BEM-1 und MAK-2 nicht in den gleichen Proteinkomplexen akkumulierten (Abb. 3.34, D).



**Abb. 3.34: MAK-2-GFP und dsRED-BEM-1 kolokalisieren während der gerichteten Keimlingsinteraktion nicht eindeutig miteinander in den gleichen Proteinkomplexen.** Der Stamm BM-5 exprimiert sowohl das am N-terminus markierte BEM-dsRED als auch das am C-terminus mit GFP markierte MAK-2-GFP jeweils unter der Kontrolle des *ccg-1* Promotors; das dsRED-BEM-1-Signal ist nur an der oberen Keimlingsspitze gut sichtbar, da sich der untere Keimling recht weit außerhalb der Fokus-Ebene befindet; **A**, Nomarski-Aufnahme, Größenbalken = 7  $\mu$ m; **B**, MAK-2-GFP, Fluoreszenz-Aufnahme (deconvolierter Bilderstapel) **C**, dsRED-BEM-1, Fluoreszenz-Aufnahme, (deconvolierter Bilderstapel); **D**, B+C übereinander gelegt; Größenbalken in B-D = 2  $\mu$ m.

Bei einem Vergleich der Lokalisierungsmuster von dsRED-BEM-1 und MAK-2-GFP zu einem späteren Zeitpunkt der Keimlingsfusion, zeigte sich deutlich, dass sich beide Proteine in ähnlicher Weise um die Fusionspore herum konzentrieren (Abb. 3.35).

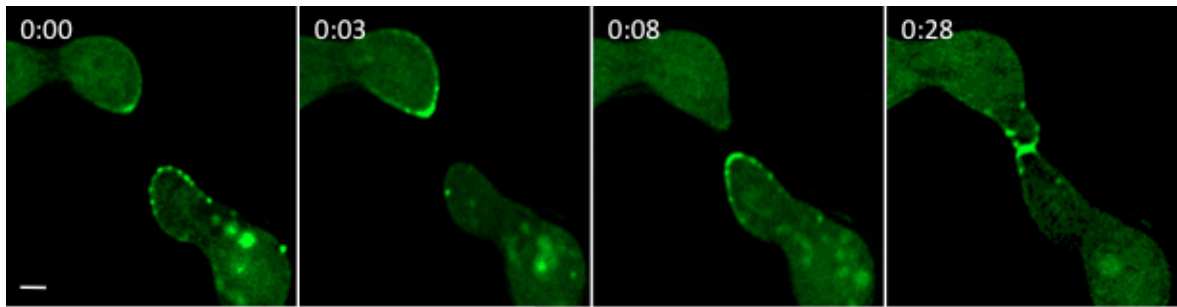


**Abb. 3.35: MAK-2-GFP und dsRED-BEM-1 kolokalisieren miteinander an der Fusionspore von fusionierenden Keimlingen.** Der Stamm BM-5 exprimiert sowohl das am N-terminus markierte BEM-dsRED als auch das am C-terminus mit GFP markierte MAK-2-GFP jeweils unter der Kontrolle des *csg-1* Promotors; **A**, MAK-2-GFP, Fluoreszenz-Aufnahme (deconvolierter Bilderstapel); **B**, dsRED-BEM-1, Fluoreszenz-Aufnahme, (deconvolierter Bilderstapel); **C**, A+B übereinander gelegt; Größenbalken = 0,5  $\mu\text{m}$ .

Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass sich BEM-1 und MAK-2 möglicherweise während dieser späten Phase der Keimlingsfusion in den gleichen Proteinkomplexen befinden und dort einen gemeinsamen Zweck erfüllen.

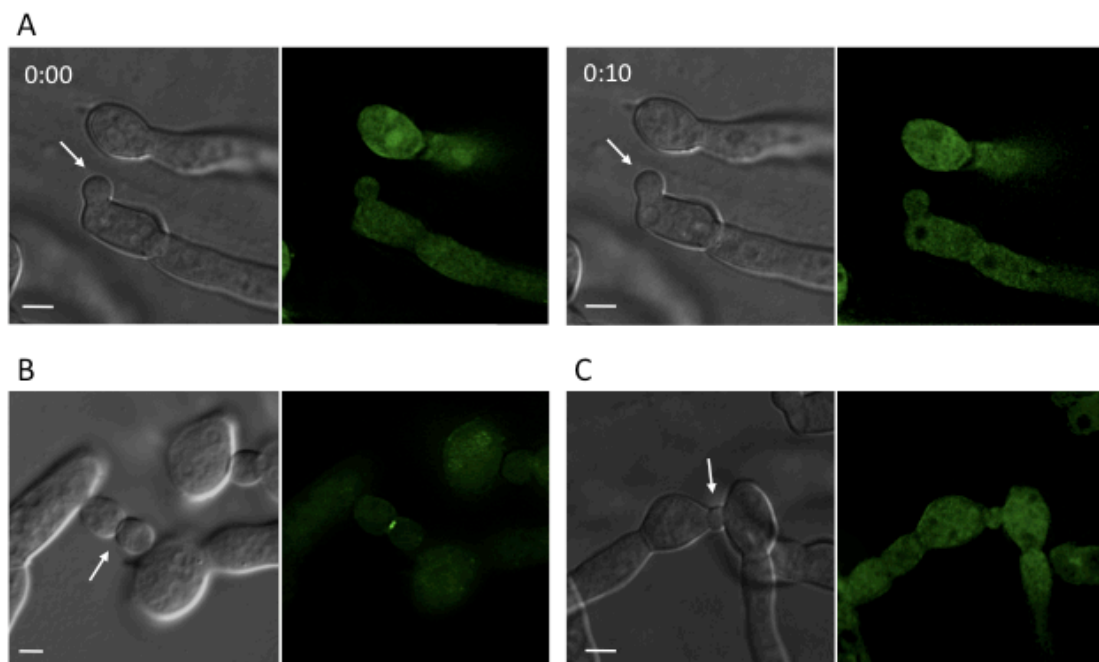
### 3.6.2 BEM-1 ist entbehrlich für die Rekrutierung von MAK-2-GFP zum Fusionspunkt während der Keimlingsfusion

Um zu prüfen, ob BEM-1 einen Einfluss auf die Rekrutierung von MAK-2 während der Keimlingsfusion hat, wurde die subzelluläre Dynamik von MAK-2-GFP in der  $\Delta bem-1$  Mutante untersucht. Hierzu wurde zunächst der MAK-2-GFP exprimierende  $\Delta bem-1$  Stamm 2-MG hergestellt, indem das Plasmid pMH-5.1 (Fleissner *et al.*, 2009b) in die Mutante 2-A1 transformiert wurde. Für ein Wildtyp-Kontrollexperiment wurde der MAK-2-GFP exprimierende Stamm N1-41 (Fleissner *et al.*, 2009b) verwendet. Im Wildtyp-Stamm konnte stets die in Fleissner *et al.* 2009 beschriebene wechselseitige Rekrutierung von MAK-2-GFP an die Zell-Spitzen von gerichtet interagierenden Keimlingen beobachtet werden. Die lokale Konzentration von MAK-2-GFP an den interagierenden Zell-Spitzen oszillierte gegenläufig in Zeitintervallen von 3-6 min, bis MAK-2-GFP gegen Ende am gemeinsamen Fusionspunkt akkumulierte. Eine repräsentative Zeitreihe ist in Abb. 3.36 dargestellt.



**Abb. 3.36: MAK-2-GFP lokalisiert wechselseitig an den Keimschlauchspitzen während der gerichteten Interaktion fusionierender Wildtyp-Keimlinge.** Der Stamm N1-41 exprimiert das am C-terminus mit GFP markierte MAK-2-GFP unter der Kontrolle des *cgg-1* Promotors; Zeitreihe von Fluoreszenz-Aufnahmen (deconvolierte Bilderstapel); Zeit in h und min; Größenbalken = 2  $\mu$ m.

In der  $\Delta$ *bem-1* Mutante hingegen konnte MAK-2-GFP niemals an der Spitze von interagierenden Keimlingen beobachtet werden (Abb. 3.37, A).



**Abb. 3.37: Das Fehlen von BEM-1 führt zu einem veränderten Lokalisierungsmuster der MAP Kinase MAK-2 während der gerichteten Keimlingsinteraktion.** A-C, MAK-2-GFP exprimierende  $\Delta$ *bem-1* Keimlinge (Stamm 2-MG); **A**, Paar in gerichteter Interaktion zu zwei verschiedenen Zeitpunkten, Zeit in h und min; **B**, Paar mit MAK-2-GFP Signal am Fusionspunkt; **C**, Paar ohne MAK-2-GFP Signal am Fusionspunkt; Pfeile markieren interagierende Zellspitzen (A), bzw. Stellen des Zell-Zell-Kontakts (B und C); Größenbalken = 5  $\mu$ m.

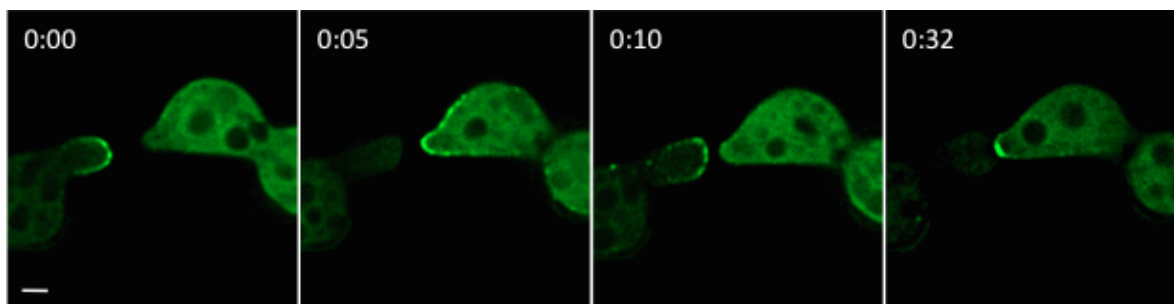
In seltenen Fällen konnte MAK-2-GFP deutlich am Fusionspunkt von Keimlingen detektiert werden, die bereits Kontakt hergestellt hatten (Abb 3.37, B). In den



meisten Fällen war es jedoch auch hier nicht möglich ein Signal zu detektieren (Abb. 3.37, C).

### 3.6.3 BEM-1 ist entbehrlich für die Rekrutierung von SO-GFP an die Plasmamembran in gerichtet interagierenden Keimlingen

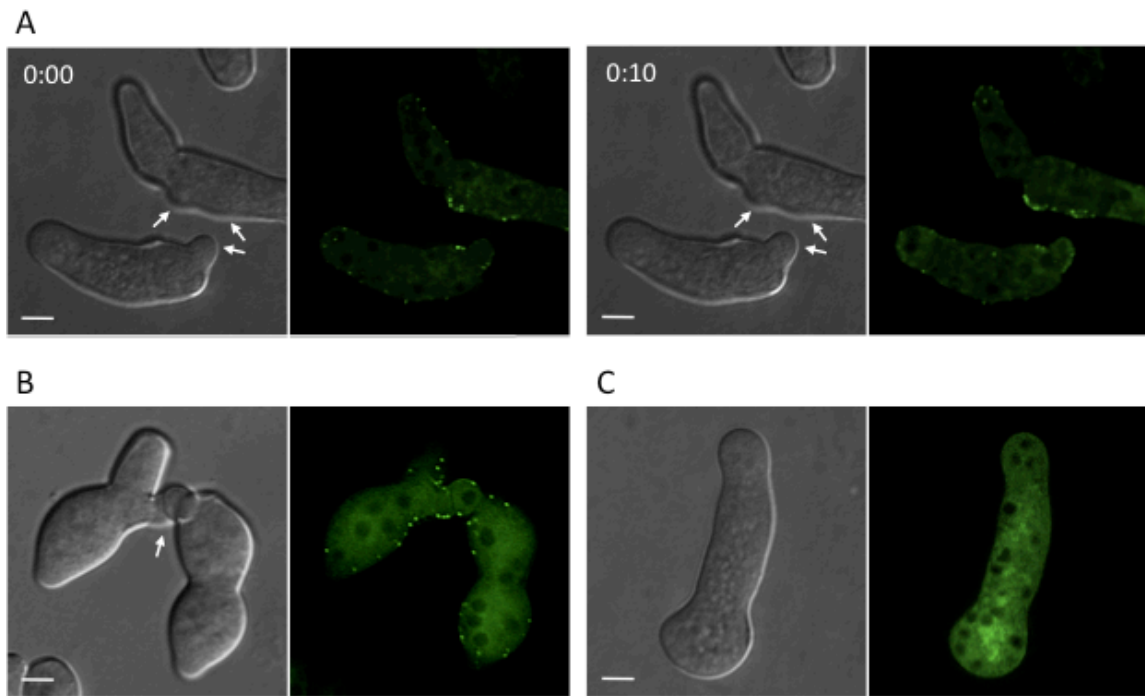
Um den Einfluss von BEM-1 auf die subzelluläre Rekrutierung von SO während der Keimlingsfusionen zu testen, wurde zunächst das Plasmid pSO-8 (Fleissner & Glass, 2007) in die  $\Delta bem-1$  Mutante 2-A1 transformiert. Der daraus resultierende SO-GFP exprimierende  $\Delta bem-1$  Stamm wurde 2-SG genannt. In einem Kontrollexperiment mit dem Wildtyp-Stamm AF-SoT8 (Fleissner & Glass, 2007) zeigte sich während der gerichteten Keimlingsinteraktion, ebenso wie in Fleissner *et al.* 2009 beschrieben, ein kontinuierlicher Wechsel zwischen SO-GFP Akkumulationen an der Zellspitze des einen Partners und der Spitze des entgegengesetzten Partners. Auch die Konzentration von SO-GFP am Fusionspunkt nach Herstellung des Zell-Zell-Kontakts wurde beobachtet (Abb. 3.38).



**Abb. 3.38: SO-GFP lokalisiert wechselseitig an den Keimschlauchspitzen während der gerichteten Interaktion fusionierender Wildtyp-Keimlinge.** Der Stamm AF-SoT8 exprimiert das am C-terminus mit GFP markierte SO-GFP unter der Kontrolle des *cgg-1* Promotors; Zeitreihe von Fluoreszenz-Aufnahmen (deconvolierte Bilderstapel); Zeit in h und min; Größenbalken = 2  $\mu$ m.

In der  $\Delta bem-1$  Mutante zeigten sich ebenfalls Akkumulationen von SO-GFP an den interagierenden Zellspitzen der Keimlinge. Allerdings wurden diese Protein-Aggregationen stets zur gleichen Zeit an den Spitzen beider Partner beobachtet und befanden sich demnach nicht im oszillatorischen Wechsel. Zudem fanden sich im Vergleich zum Wildtyp auffallend mehr SO-GFP Akkumulationen über die gesamte Plasmamembran beider Keimlinge verteilt (Abb. 3.39, A).





**Abb. 3.39: Das Fehlen von BEM-1 führt zu einem veränderten Lokalisierungsmuster des SO-Proteins während der gerichteten Keimlingsinteraktion. A-C, SO-GFP exprimierende  $\Delta bem-1$  Keimlinge (Stamm 2-SG); A, Paar in gerichteter Interaktion zu zwei verschiedenen Zeitpunkten, Zeit in h und min; B, Paar, welches bereits Zell-Zell-Kontakt hergestellt hat; C, nicht interagierender Keimling; Pfeile markieren interagierende Zellspitzen (A), bzw. Stelle des Zell-Zell-Kontakts (B); Größenbalken = 5  $\mu$ m.**

Für die  $\Delta bem-1$  Keimlingspaare, die bereits Zell-Zell-Kontakt hergestellt hatten, zeigte sich in keinem Fall eine klare SO-GFP Akkumulation an der Kontaktstelle, wie es für Wildtyp-Paare üblich ist. Vielmehr blieben in diesem Stadium die punktförmigen Akkumulationen weiterhin über die Plasmamembranen beider Partner verteilt (Abb. 3.39, B). In nicht interagierenden  $\Delta bem-1$  Keimlingen wurden hingegen zu keinem Zeitpunkt SO-GFP Akkumulationen in der Plasmamembran detektiert (Abb. 3.39, C). Dies deutet darauf hin, dass, wie auch im Wildtyp, die beobachteten SO-GFP Akkumulationen in den  $\Delta bem-1$  Keimlingen mit den gerichteten Interaktionen in einem Zusammenhang stehen.

#### **3.6.4 Die gerichteten Keimlingsinteraktionen und die Keimlingsfusion der $\Delta bem-1$ Mutante sind instabil**

Die Interpretation der Ergebnisse der MAK-2-GFP und SO-GFP Lokalisierungsstudien, welche während der Keimlingsinteraktionen in der  $\Delta bem-1$  Mutante durchgeführt wurden, werden dadurch erschwert, dass sich das gerichtete Wachstum der

interagierenden  $\Delta bem-1$  Keimlinge niemals direkt beobachten ließ. Zwar wiesen die während des Mikroskopierens sequenziell aus dem Inkubator entnommenen frischen Proben im zeitlichen Verlauf eine deutliche Zunahme der  $\Delta bem-1$  Keimlingsfusionen auf. Sobald ein Deckgläschen auf die auf dem Agarblock befindlichen Keimlinge platziert wurde, zeigten sich jedoch keine neu induzierten gerichteten Interaktionen mehr (vgl. M&M, Abschnitt 2.6.1). Die bereits induzierten gerichteten Interaktionen hingegen schienen noch vor Beginn der mikroskopischen Analyse zu einem Ende zu kommen, so dass es nahezu unmöglich war, Keimlingspaare zu beobachten, die noch keinen Zell-Zell-Kontakt hergestellt hatten. Insgesamt wurden in unterschiedlichsten Experimenten 80  $\Delta bem-1$  Keimlingspaare in Hinblick auf MAK-2-GFP Lokalisierung und 80  $\Delta bem-1$  Paare auf SO-GFP Lokalisierungen untersucht. Von diesen 160 Paaren hatten insgesamt 9 Paare noch keinen Zell-Zell-Kontakt hergestellt. Gerichtetes Wachstum war während des Mikroskopierens jedoch bei keinem dieser 9 Paare in Echtzeit zu beobachten.

Unabhängig von den gerichteten Interaktionen wurde ebenfalls getestet, ob die  $\Delta bem-1$  Keimlinge, welche bereits im Inkubator Zell-Zell-Kontakt hergestellt hatten, in der Lage sind, nach Auflage des Deckgläschens zu fusionieren. Zu diesem Zweck wurden *gfp* markierte  $\Delta bem-1$  Konidien mit unmarkierten  $\Delta bem-1$  Konidien gemischt. In diesen Experimenten zeigte sich, dass von 24 untersuchten heterogenen Keimlingspaaren kein einziges in der Lage war, während des Mikroskopierens zu fusionieren. Eine Vermischung von markiertem und unmarkiertem Zytoplasma nach Beginn des Mikroskopierens konnte nicht beobachtet werden. Aus den Kolokalisierungsexperimenten mit dsRED-BEM-1 und MAK-2-GFP (Abschnitt 3.6.1) war bekannt, dass Wildtyp-Keimlinge in der Regel problemlos während des Mikroskopierens miteinander fusionieren. Angesichts der nicht unerheblich hohen Fusionskompetenz der  $\Delta bem-1$  Keimlinge unter Inkubator-Bedingungen (vgl. Abschnitt 3.3.6) lässt sich schließen, dass die Umstände des Mikroskopierens dem Fusionieren der  $\Delta bem-1$  Keimlinge entgegenwirken.

Die folgenden Ausführungen betreffen Versuche, die mit dem Ziel durchgeführt wurden, ein Beobachten des gerichteten Wachstums der  $\Delta bem-1$  Keimlinge während des Mikroskopierens zu ermöglichen. Auf Quantifizierungen wurde diesbezüglich verzichtet, was bei der Interpretation der Daten berücksichtigt werden sollte.

Dennoch könnten die hier dargelegten Beobachtungen richtungsweisend für weiterführende Untersuchungen sein. Um einen Temperatureffekt auszuschließen, wurden die Objekte während des Mikroskopierens auf Inkubator-Temperatur (30°C) temperiert. Dies hob jedoch nicht die Fusionsdefekte der *Δbem-1* Keimlinge auf. Da im Vergleich zu den Bedingungen im Inkubator ein erniedrigter Sauerstoffpartialdruck während des Mikroskopierens zu erwarten ist, wurde vermutet, dass die *Δbem-1* Keimlinge möglicherweise empfindlicher gegenüber diesem Faktor sein könnten. Um für einen höheren Sauerstoffpartialdruck während des Mikroskopierens zu sorgen, wurden die *Δbem-1* Keimlinge in speziellen Mikroskopie-Kammern inkubiert, die für ein inverses Mikroskop bestimmt sind. Diese Vorgehensweise hat den Vorteil, dass die Keimlinge nicht mit einem Deckgläschen bedeckt sind, sondern lediglich mit einem dünnen Film bestehend aus flüssigem Minimalmedium. Dieser Flüssigkeitsfilm hat seinerseits direkten Kontakt zur umgebenden Raumluft und sollte einen besseren Sauerstoff-Austausch gewährleisten. Eine Inkubation der *Δbem-1* Sporen in diesen Kammern führte dazu, dass diese zunächst sehr gut auskeimten und lange Keimschläuche bildeten. Im Gegensatz zum Wildtyp, welcher ebenfalls gut keimte und zudem nach 3 h zahlreich fusionierte, konnten bei zweimaliger Durchführung des Experiments nach jeweils 6 h jedoch keinerlei Fusionen zwischen den *Δbem-1* Keimlingen detektiert werden. In Experimenten mit Medium, welches zuvor mit Sauerstoff angereichert wurde (vgl. M&M, Abschnitt 2.6.1), konnte der Fusionsdefekt der *Δbem-1* Keimlinge ebenfalls nicht aufgehoben werden.

Die geschilderten Versuche, den *Δbem-1* Keimlingen in Flüssigkultur ein Fusionieren unter Mikroskopie-Bedingungen zu ermöglichen, blieben demnach erfolglos. Daher wurden weitere Experimente an einem inversen Mikroskop durchgeführt. Hierbei wurden die Keimlinge nicht in Flüssigkultur, sondern auf Festmedium inkubiert. Nach der Keimung der Konidien auf Minimal-Agar im Inkubator wurde zwar ein Deckgläschen auf den Keimlingen platziert, die gegenüberliegende Seite des Agarblöckchens wurde jedoch nicht wie bei einem aufrechten Mikroskop auf einen Objektträger gelegt, sondern hatte direkten Kontakt mit der Raumluft. Verglichen mit der aufrechten Mikroskopie ist somit bei dieser Vorgehensweise ein größerer Gasaustausch zwischen dem Agarblock und der Raumluft möglich. Diese Experimente

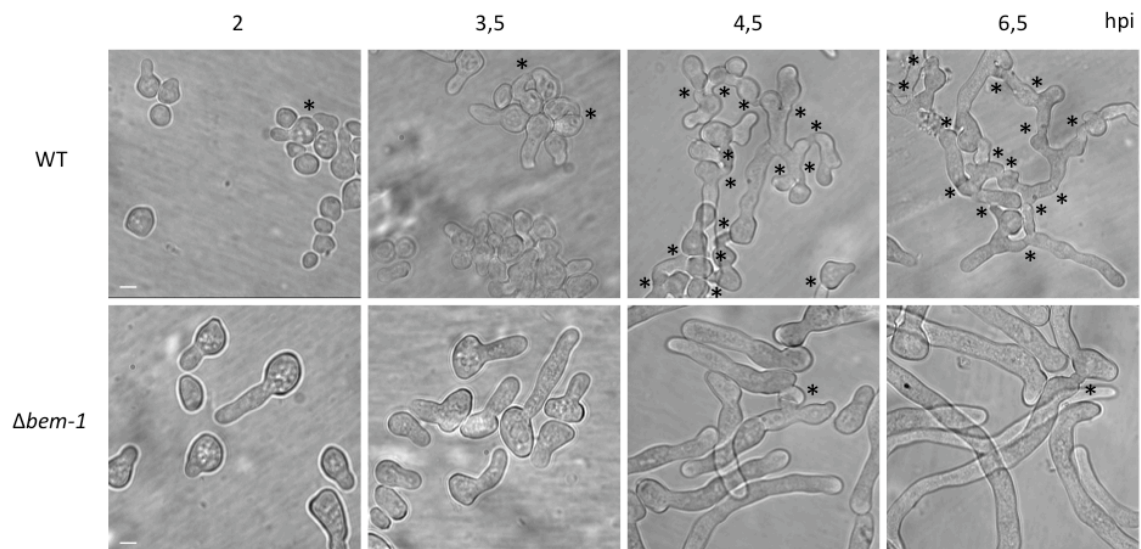
am inversen Mikroskop führten allerdings ebenfalls nicht zu einer Aufhebung der Fusionsdefekte der  $\Delta bem-1$  Keimlinge.

Diese Beobachtungen führten zu der Schlussfolgerung, dass sowohl die gerichteten Keimlingsinteraktionen als auch die Zell-Zell-Fusionen in der  $\Delta bem-1$  Mutante instabil sind und während des Mikroskopierens innerhalb weniger Minuten zum Erliegen kommen.

### 3.6.5 Das Fehlen von BEM-1 führt zu einer verzögerten Aktivierung von MAK-2

In einem früheren Bericht wurde gezeigt, dass die MAP Kinase MAK-2 von *N. crassa* während der Keimung und Fusion der Konidien aktiviert wird. Diese Aktivierung äußerte sich in einer Zunahme der phosphorylierten Form von MAK-2 (Pandey *et al.*, 2004). Um zu überprüfen, ob BEM-1 hierbei eine Funktion übernimmt, wurde die Aktivierung von MAK-2 im zeitlichen Verlauf der Konidiosporenkeimung und Keimlingsfusion in der  $\Delta bem-1$  Mutante untersucht.

Zu diesem Zweck wurden zunächst Konidien des Wildtyps und der  $\Delta bem-1$  Mutante auf Minimalmedium-Agarplatten ausplattiert. Auf diesen Platten waren zuvor Cellophan-Scheiben platziert worden, welche der schnellen Ernte der ausgekeimten Konidien dienten (vgl. M&M, Abschnitt 2.10.8). Beim Wildtyp zeigten sich die ersten Fusionen bereits nach zweistündiger Inkubation bei 30°C (Abb. 3.40). Die stärkste Zunahme an Fusionsereignissen erfolgte zwischen 3,5 und 4,5 h. Nach 4,5 h war hingegen kein weiterer Anstieg mehr erkennbar. Die Wildtyp-Keimlinge waren demnach zwischen 3,5 h und 4,5 h hinsichtlich der Zell-Zell-Fusionen am aktivsten.

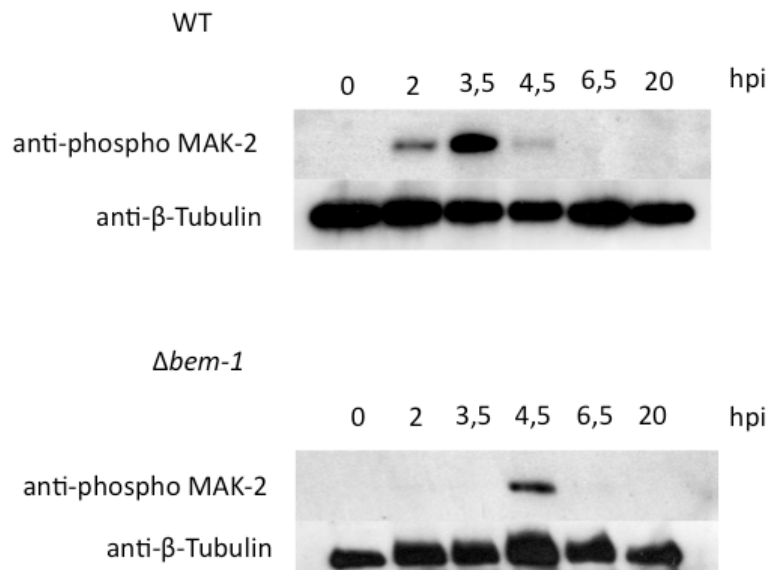


**Abb. 3.40: Nomarski-Aufnahmen ausgewählter Zeitpunkte von keimenden und fusionierenden Konidien.** Konidien bzw. Keimlinge von Wildtyp-Stamm N1-06 (oben) und  $\Delta bem-1$  Mutante 21-A1 (unten) auf Cellophan-Agarplatten (Vogel's MM) bei 30°C; hpi = Stunden nach Inokulation (*hours post-inoculation*); Sternchen markieren fusionierende und bereits fusionierte Keimlinge. Größenskalen = 5  $\mu$ m.

Die  $\Delta bem-1$  Keimlinge zeigten hingegen erst nach 4,5 h die ersten Fusionsereignisse. Zwischen 4,5 h und 6,5 h konnte nur eine leichte Zunahme beobachtet werden. Die höchste Fusionsaktivität der  $\Delta bem-1$  Keimlinge fand demnach zwischen 3,5 h und 6,5 h statt.

Zu den entsprechenden Zeitpunkten zwischen 0 und 20 Stunden nach Inokulation wurden die jeweiligen Proben geerntet und deren Gesamtproteinextrakte mittels Western-Blot analysiert. Hierbei wurde ein Antikörper verwendet, welcher gegen die phosphorylierte Form der MAP Kinase MAK-2 gerichtet ist. Da kein Antikörper verfügbar war, welcher gegen die nicht phosphorylierte Form von MAK-2 gerichtet ist, wurde zur Kontrolle eine Hybridisierung mit einem  $\beta$ -Tubulin-Antikörper durchgeführt.

Im Wildtyp-Kontrollexperiment war bereits zwei Stunden nach Inokulation eine Aktivierung von MAK-2 zu beobachten. Diese erreichte nach 3,5 Stunden ihren Höhepunkt und war nach 4,5 Stunden wieder deutlich abgeschwächt (Abb. 3.41).

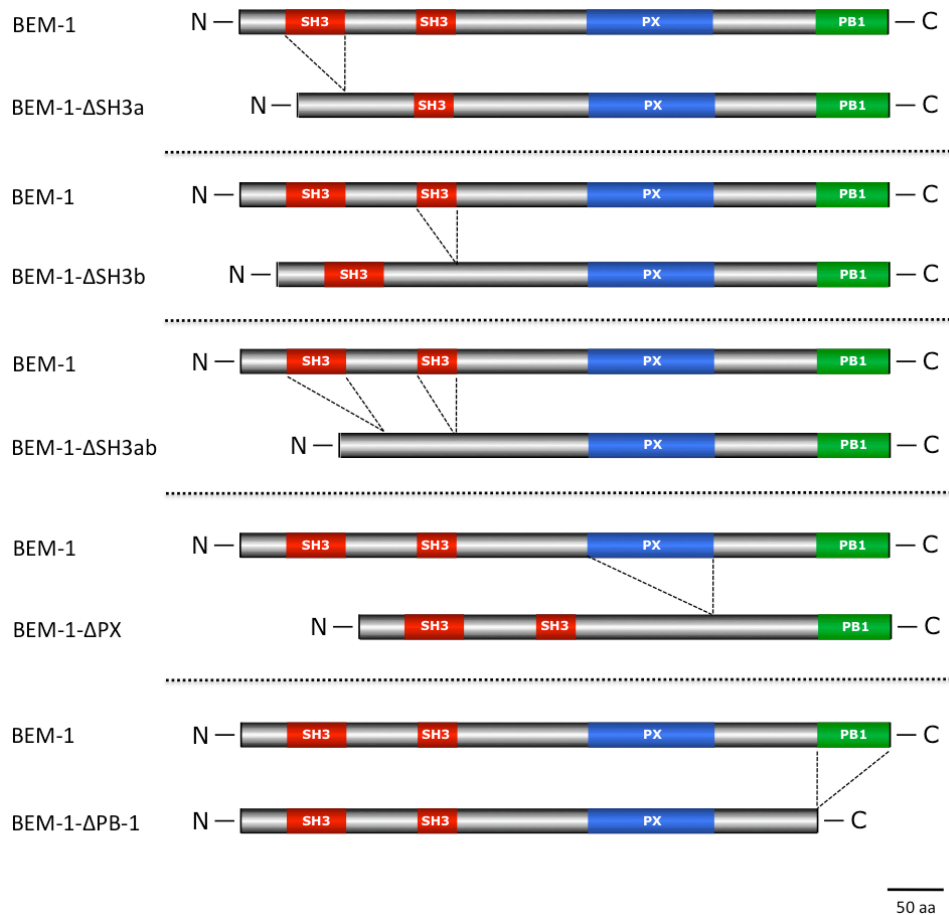


**Abb. 3.41: Western-Blot zur Detektierung von phosphoryliertem MAK-2 während der Konidiosporenkeimung und Keimlingsfusion.** Konidien von Wildtyp-Stamm N1-06 (oben) und  $\Delta bem-1$  Mutante 21-A1 (unten) wurden auf Cellophan-Agarplatten ausplattiert und bei 30°C inkubiert. Die Ernte erfolgte zu den angegebenen Zeitpunkten zwischen 0 und 20 Stunden nach der Inokulation (hpi, *hours postinoculation*). Die Gesamtprotein-Extrakte wurden mithilfe eines Antikörpers gegen phosphoryliertes MAK-2 untersucht. Für eine Kontroll-Hybridisierung wurde ein Antikörper gegen  $\beta$ -Tubulin verwendet.

In der  $\Delta bem-1$  Mutante konnte die phosphorylierte Form von MAK-2 hingegen erst nach 4,5 Stunden detektiert werden (Abb. 3.41). In dem Zeitraum, in welchem die  $\Delta bem-1$  Konidiosporen auskeimten, wurde demnach keine MAK-2 Aktivierung detektiert. Die Aktivierung von MAK-2 korrelierte deutlich mit der Phase, in der die  $\Delta bem-1$  Keimlinge hinsichtlich der Zell-Zell-Fusionen am aktivsten waren.

### 3.7 Analyse der Funktionen der einzelnen BEM-1 Proteindomänen

Um die vier konservierten BEM-1 Protein-Domänen hinsichtlich ihrer Funktion zu untersuchen, wurden alle vier Domänen einzeln deletiert (Abb. 3.42; siehe auch Abb. 3.1 und EL, Abschnitt 1.5). Des weiteren wurden beide SH3-Domänen zusätzlich gemeinsam deletiert.



**Abb. 3.42: Schematische Darstellung der verschiedenen Domänen Knock-outs des BEM-1 Proteins von *N. crassa*.** Informationen zu den einzelnen Domänen siehe Abschnitt 1.5 und Abb. 3.1.

#### 3.7.1 Konstruktion der BEM-1 Domänen Knock-out Stämme

Zur Deletionen der einzelnen BEM-1-Domänen in *N. crassa* wurden zunächst die entsprechenden *bem-1* Konstrukte hergestellt, bei welchen die jeweiligen Domänen ausgespart wurden. Diese Konstrukte wurden daraufhin in die Null-Mutante transformiert. Die einzelnen Fragmente für die Herstellung der ΔSH3a-, ΔSH3b -, ΔSH3ab - und ΔPX - Deletionskonstrukte wurden mit Hilfe der PCR von genomischer DNA amplifiziert und mittels *Yeast Recombinational Cloning* (vgl. M&M, Abschnitt 2.10.6) miteinander kombiniert. Die verwendeten Primer sowie Größen

und Positionen der ausgesparten Bereiche sind in Tabelle 3.2 aufgeführt. Die durch die Hefe rekombinierten Fragmente wurden mithilfe der beiden äußeren Primer von der Hefe-DNA amplifiziert und über *XbaI* (221) und *EcoRI* (140) in den Vektor pMF272 kloniert.

**Tab. 3.2: Längen und Positionen der deletierten Proteinsequenzen der verschiedenen Konstrukte zur Deletion der einzelnen Domänen des BEM-1-Proteins sowie verwendete Primer und Bezeichnungen der fertigen Plasmide.**

Deletion	Länge (As)	Position (As)	Primer	Plasmid
$\Delta$ SH3a	56	39-94	140, 221, 255, 256	pbem1-dSH3a-2
$\Delta$ SH3b	38	151-188	140, 221, 257, 258	pbem1-dSH3b-2
$\Delta$ SH3ab	94	39-94 und 151-188	140, 221, 255, 258, 259, 260	pbem1-dSH3ab-1
$\Delta$ PX	112	306-417	140, 221, 224, 225	pbem1-dPX-ST2
$\Delta$ PB1	76	501-576	141, 201	pbem1-ST-dPB1-8

Die fertigen Vektoren (Tab. 3.2) wurden jeweils in den Stamm  $\Delta$ bem-1-2-A1 transformiert. Die Transformanten wurden über Einzelsporisolierung aufgereinigt und mittels PCR überprüft.

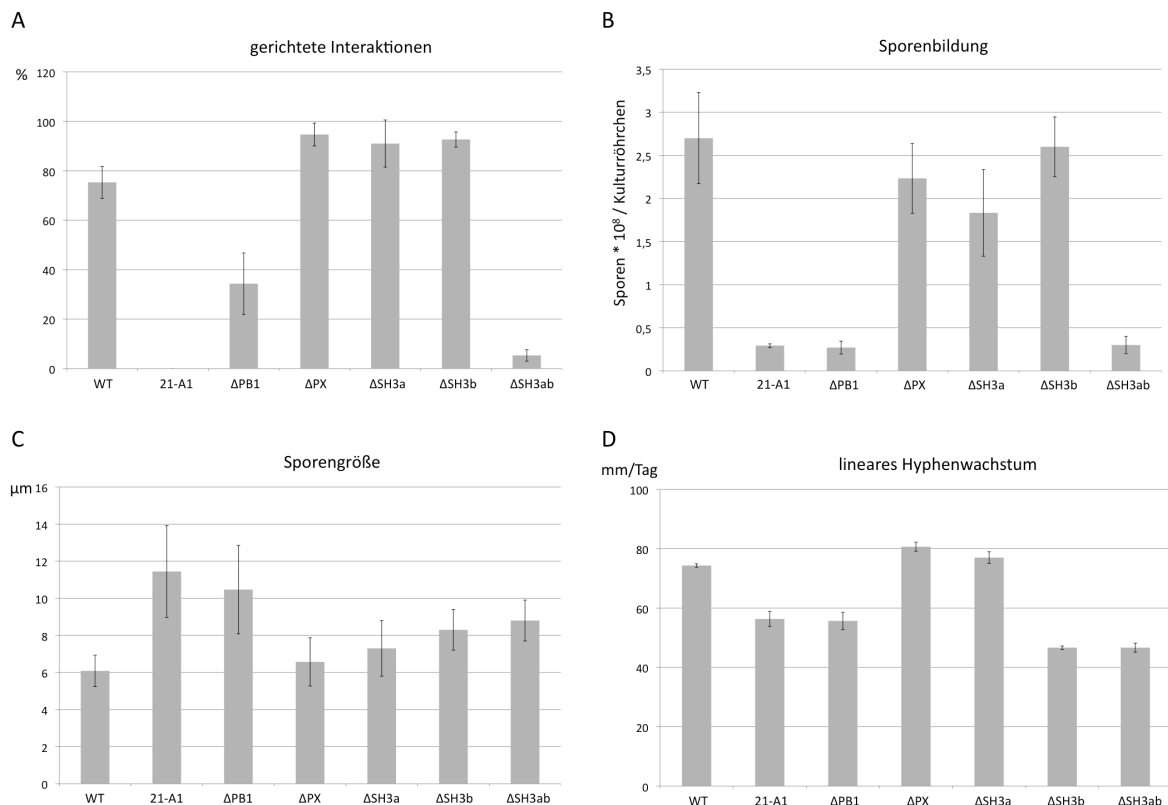
Im Gegensatz zur Klonierung der soeben beschriebenen Konstrukte wurde das  $\Delta$ PB1-Konstrukt nicht mittels *Yeast Recombinational Cloning* hergestellt. Da hier keine Fragmente aus der Mitte des Gens ausgespart wurden, sondern lediglich der entsprechende 3'-Bereich ausgelassen wurde, ließ sich das  $\Delta$ PB1-Fragment direkt über *XbaI* und *EcoRI* in den Vektor pMF272 klonieren.

### 3.7.2 Die beiden SH3-Domänen übernehmen partiell redundante Funktionen

Durch die Expression des  $\Delta$ SH3a-Konstrukts wurde der Defekt der  $\Delta$ bem-1 Mutante hinsichtlich der gerichteten Keimlingsinteraktionen vollständig komplementiert. Nach 2,5 stündiger Inkubationszeit wies der  $\Delta$ SH3a Stamm keine Unterschiede zum Wildtyp auf (Abb. 3.43, A). Gleiches galt für den Stamm  $\Delta$ SH3b. Eine simultane Deletion beider Domänen führte jedoch zu einer starken Reduzierung der gerichteten Interaktionen auf ein Niveau vergleichbar mit dem der  $\Delta$ bem-1 Mutante 21-A1 (Abb. 3.43, A). Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass die beiden SH3-Domänen hinsichtlich der Funktionen von BEM-1 während der zellulären Kommunikation und des gerichteten Wachstums redundante Rollen übernehmen. Ähnliches war auch bei einem Vergleich der Sporulationsraten zu beobachten.



Während die Sporulationsraten der Stämme  $\Delta$ SH3a und  $\Delta$ SH3b keine Unterschiede zum Wildtyp aufwiesen, zeigte sich eine starke Reduzierung in der Doppeldeletionsmutante  $\Delta$ SH3ab (Abb. 3.43, B).

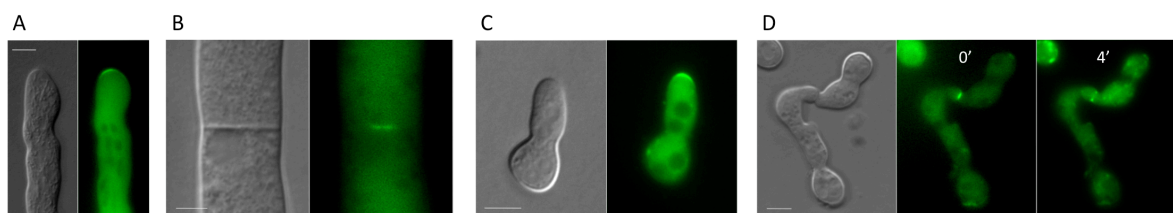


**Abb. 3.43: Phänotypische Charakterisierung der Mutanten, in denen die einzelnen BEM-1 Domänen deletiert wurden.** Der Wildtyp-Stamm N1-06 und die *Abem-1* Mutante 21-A1 wurden als Referenz-Stämme verwendet. **A**, Gerichtete Keimlingsinteraktionen nach 2,5 h Inkubation bei 30°C; **B**, Sporenbildung (Sporen pro Kulturröhrchen 10 Tage nach Inokulation); **C**, Sporengröße; **D**, lineares Hyphenwachstum; Fehlerbalken repräsentieren Standardabweichung; numerische Angaben siehe Anhang, Tabellen 5.15 - 5.18.

Hinsichtlich der Sporengröße zeigten alle drei Stämme einen intermediären Phänotyp (Abb. 3.43, C). Die Wachstumsrate war durch die Abwesenheit der SH3a-Domäne nicht beeinträchtigt, zeigte jedoch eine signifikante Reduzierung in Stamm  $\Delta$ SH3b. Die Deletion beider Domänen hatte keinen verstärkenden Einfluss auf diesen Phänotyp (Abb. 3.43, D). Somit ist die SH3b-Domäne allein verantwortlich für die Wachstumsrate des Wildtyps, während die SH3a-Domäne hierfür entbehrlich ist.

### 3.7.3 Die PX-Domäne hat weder Einfluss auf die Funktionen von BEM-1 noch auf seine subzelluläre Lokalisierung

Durch Expression des  $\Delta$ PX-Konstrukts wurde eine vollständige Komplementierung der beobachteten phänotypischen Defekte der *Abem-1* Mutante erreicht (Abb. 3.43, A-D). Dies deutet darauf hin, dass BEM-1 die PX-Domäne für das Erfüllen seiner Funktionen entbehren kann. Da die PX Domäne eine Rolle dabei spielt, Proteine durch die Bindung an Phosphoinositide mit der Zellmembran zu verknüpfen (vgl. EL, Abschnitt 1.5), wurde darüber hinaus getestet, ob eine PX Deletion einen Einfluss auf die subzelluläre Lokalisierung von BEM-1 hat. Zu diesem Zweck wurde zunächst ein GFP markiertes  $\Delta$ PX-Konstrukt hergestellt. Hierzu wurden die entsprechenden Fragmente mithilfe der Primer 221, 223, 224 und 225 ausgehend von genomischer DNA per PCR amplifiziert und mithilfe des *Yeast Recombinational Cloning* rekombiniert. Nach Amplifikation des rekombinanten Fusionskonstruktes aus der Hefe-DNA mit den beiden äußeren Primern 221 und 223 wurde das  $\Delta$ PX-Konstrukt über *XbaI* und *PacI* in den Vektor pMF272 ligiert, so dass der Vektor pbem1-dPX-gfp-ST3 entstand, welcher ein *Pccg-1* getriebenes  $\Delta$ PX-*gfp* Konstrukt enthielt. Nach Integration dieses Vektors in den *Abem-1* Stamm 2-A1 konnten zahlreiche GFP-positive Transformanten selektioniert werden, welche alle makroskopisch vom Wildtyp-Stamm ununterscheidbar waren. Der Stamm  $\Delta$ PX-G zeigte nach Aufreinigung durch Einzelsporisolierung neben anderen Stämmen ein deutliches GFP-Signal und wurde zur darauf folgenden Untersuchung der subzellulären Lokalisierung von BEM-1- $\Delta$ PX verwendet. Das beobachtete Lokalisierungsmuster von BEM-1- $\Delta$ PX-GFP wies im Vergleich zu dem des Wildtyp BEM-1-GFPs keine Unterschiede auf (Abb. 3.44 A-D; vgl. Abschnitt 3.4).



**Abb. 3.44: BEM-1- $\Delta$ PX-GFP zeigt hinsichtlich der subzellulären Lokalisierung keine Unterschiede zum Wildtyp BEM-1-GFP.** BEM-1- $\Delta$ PX-GFP lokalisiert an Hyphenspitze (A), Septum (B), Keimlingsspitze (C) und konzentriert sich am Ort des Zell-Zell-Kontakts während der Keimlingsfusion sowie an der sich öffnenden Fusionspore (D); Stamm  $\Delta$ PX-G; Zeitangabe in D in min. Größenbalken = 5  $\mu$ m.

Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass die PX-Domäne für die Bindung von BEM-1 an die Plasmamembran nicht essentiell ist.

#### **3.7.4 Die PB1-Domäne hat einen Einfluss auf die gerichteten Keimlingsinteraktionen und die Definition der Sporengröße**

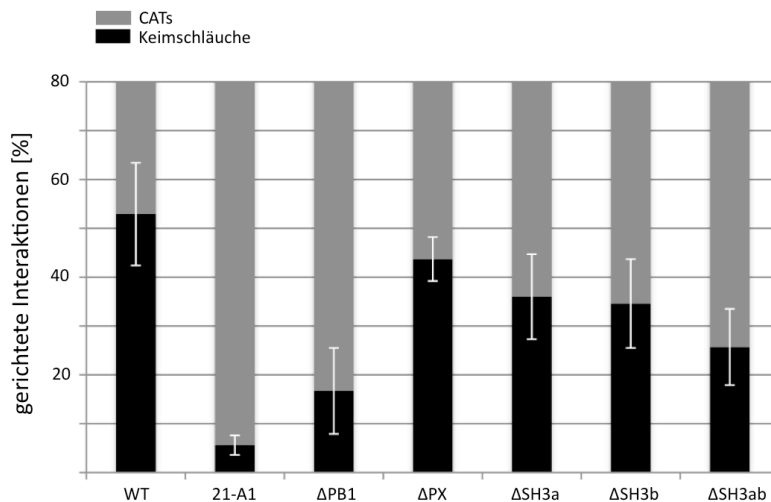
Die Expression des  $\Delta$ PB1-Konstrukts führte zu einer partiellen Komplementierung des  $\Delta$ bem-1 Phänotyps. Die gerichteten Interaktionen zwischen den  $\Delta$ PB1-Keimlingen waren im Vergleich zur  $\Delta$ bem-1 Mutante nach 2,5 h Inkubationszeit signifikant erhöht. Das Niveau des Wildtyps wurde jedoch nicht erreicht (Abb. 3.43, A). Die Funktion, welche BEM-1 bei der Keimlingsinteraktion übernimmt hängt somit nicht allein von der PB1-Domäne ab. Dennoch spielt die PB1-Domäne hierbei offensichtlich eine wichtige Rolle. Die Defekte der  $\Delta$ bem-1 Mutante hinsichtlich Wachstumsrate, Sporulation und Sporengröße konnten nicht durch das  $\Delta$ PB1-Konstrukt komplementiert werden (Abb. 3.43, B-D). Die PB1-Domäne ist demnach eine wesentliche Domäne für die Gewährleistung der BEM-1 Funktionen, welche bei der Ausprägung dieser phänotypischen Charakteristika eine Rolle spielen.

Als wichtige Schlussfolgerung lässt sich daraus ableiten, dass der Defekt bezüglich der gerichteten Interaktionen teilweise, die abnormale Sporengröße jedoch in keinster Weise durch das  $\Delta$ PB1-Konstrukt komplementiert wurde. Diese Daten zeigen, dass die abnormale Sporengröße offensichtlich nicht in direkter Verbindung mit einer verminderten Kompetenz steht, gerichtete Interaktionen einzugehen.

#### **4.7.5 Die BEM-1-Domänen PB1, SH3a und SH3b fördern die gerichteten Interaktionen der Keimschlauchspitzen**

Die gerichteten Keimlingsinteraktionen der  $\Delta$ bem-1 Mutante sind stark reduziert. Dies betrifft sowohl die Keimschlauchspitzen- als auch die CAT-Interaktionen. Es zeigte sich, dass die  $\Delta$ bem-1 Keimlinge nicht mithilfe ihrer Keimschlauchspitzen interagieren können, allerdings zu einem geringen Teil über CATs (vgl. Abschnitt 3.3.6). Die Deletionen der einzelnen BEM-1-Domänen zeigten, dass die PB1-Domäne und beide SH3-Domänen die gerichteten Keimlingsinteraktionen wesentlich unterstützen. Dies führte zu der Frage, ob einzelne BEM-1 Domänen die

Keimschlauchspitzen-Interaktionen fördern während andere die CAT-Interaktionen unterstützen. Für die Quantifizierung der Zahlenverhältnisse beider Arten von Interaktionen in den Domänen-Deletionsmutanten wurden der Wildtyp und die *Δbem-1* Mutante nochmals mitgeführt. Sowohl für den Wildtyp als auch für die *Δbem-1* Mutante konnten die Tendenzen der ersten Quantifizierung (vgl. Abschnitt 3.3.6) bestätigt werden. Allerdings wurden in dieser Quantifizierung für die *Δbem-1* Mutante zu einem geringen Anteil auch Keimschlauchspitzen-Interaktionen detektiert (Abb 3.45). Unter diesen Interaktionen fanden sich jedoch nur solche, die zwischen einer Keimschlauchspitze und einem CAT des Partners stattfanden. Interaktionen zwischen zwei aufeinander zuwachsenden Keimschlauchspitzen, wie sie beim Wildtyp häufig zu beobachten sind, zeigten sich nicht.



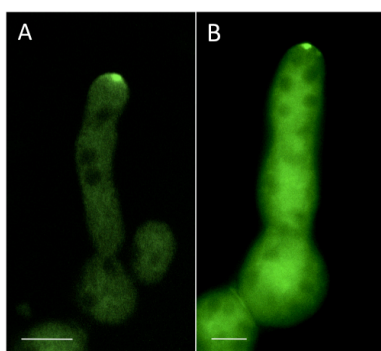
**Abb. 3.45: Prozentuale Anteile der Keimschlauchspitzen-Interaktionen und die der CAT-Interaktionen gemessen an der Gesamtzahl der Interaktionen.** Die Quantifizierungen wurden nach 2,5 bis 5 h Inkubation bei 30°C vorgenommen. Fehlerbalken repräsentieren Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten; numerische Angaben siehe Anhang, Tab. 5.19.

Im Vergleich zum Wildtyp zeigten die Stämme *ΔPB1* und *ΔSH3ab* eine signifikante Reduzierung der Keimschlauchspitzen-Interaktionen. Die Keimlinge beider Stämme interagierten dementsprechend im Verhältnis häufiger über CATs. Bei allen anderen untersuchten Stämmen war keine signifikante Veränderung dieses Verhältnisses zu erkennen. Somit scheinen lediglich die PB1-Domäne und die beiden SH3-Domänen die gerichteten Interaktionen der Keimschlauchspitzen zu fördern. Die Reduzierung der Gesamtzahl der gerichteten Interaktionen korreliert demnach in den Domänen-Deletionsmutanten ebenso wie in der *Δbem-1* Mutante mit einer deutlichen

Reduzierung der Keimschlauchspitzen-Interaktionen. Demzufolge lassen sich den einzelnen Domänen keine spezifischen Keimschlauchspitzen- bzw. CAT-fördernden Funktionen zuschreiben. Dies zeigt, dass ein intaktes BEM-1 nötig ist, um beide Arten der gerichteten Keimlingsinteraktionen zu verstärken.

### 3.8 Untersuchung des Einflusses von BEM-1 auf die Polarisomkomponente SPA-2 und das Spitzenkörperprotein CHS-1

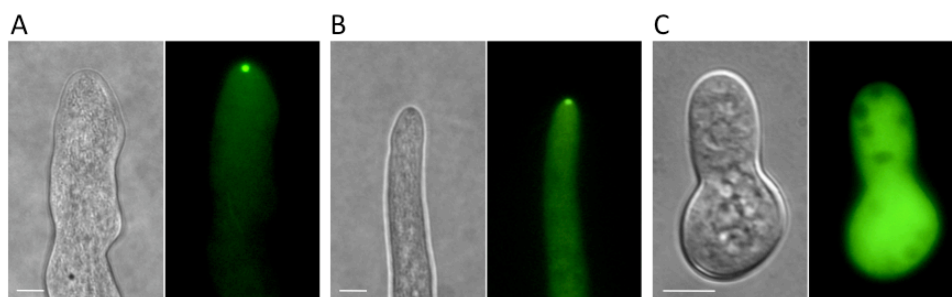
Studien mit *A. nidulans* zeigten, dass BemA (Bem1p) einen Einfluss auf die subzelluläre Organisation von Polarisom und Spitzenkörper hat (Leeder & Turner, 2008) (vgl. EL, Abschnitt 1.3.1). Aus diesem Grund erschien es interessant zu untersuchen, ob BEM-1 in *N. crassa* möglicherweise eine ähnliche Rolle übernimmt. Als Marker für das Polarisom wurde die GFP-markierte Polarisomkomponente SPA-2 verwendet. Die subzelluläre Lokalisierung von SPA-2 wurde in *N. crassa* bereits beschrieben und ähnelt stark der Lokalisierung von SepA (Bni1p) und SpaA (Spa2p) in *A. nidulans* (Araujo-Palomares *et al.*, 2009). Das durch den *ccg-1* Promotor getriebene *spa-2-gfp* Konstrukt wurde zunächst mithilfe des Vektors pUB161 in die  $\Delta$ *bem-1* Mutante 2-A1 eingebracht. Der für die mikroskopischen Analysen verwendete SPA-2-GFP exprimierende  $\Delta$ *bem-1* Stamm wurde als 2-SPG-10 bezeichnet. Der Vektor pUB161 sowie der als Kontrolle dienende SPA-2-GFP exprimierende Wildtyp-Stamm GN1-76 wurden von Ulrike Brandt hergestellt. Sowohl an den Keimlingsspitzen des Wildtyps als auch an denen der  $\Delta$ *bem-1* Mutante konnte SPA-2-GFP detektiert werden (Abb. 3.46). Das Muster deckte sich in beiden Stämmen mit der in Araujo-Palomares *et al.* beschreibenden Kappe, welche etwas subapikal eine zentrale kugelförmige Struktur aufwies (Araujo-Palomares *et al.*, 2009).



**Abb. 3.46: SPA-2-GFP zeigt kein abnormales Lokalisierungsmuster in Keimlingen des Wildtyps und der  $\Delta$ *bem-1* Mutante.** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen eines Wildtyp-Keimlings (A, Stamm GN1-76, LSM-Aufnahme) sowie eines  $\Delta$ *bem-1* Keimlings (B, Stamm 2-SPG-10, epifluoreszenzmikroskopische Aufnahme). Größenbalken = 5  $\mu$ m.

BEM-1 hat demnach keinen signifikanten Einfluss auf die subzelluläre Organisation des Polarisoms in *N. crassa*.

Um die Frage zu klären, ob BEM-1 die Organisation des Spitzenkörpers beeinflusst, wurde GFP-markiertes CHS-1 in die  $\Delta bem-1$  Mutante 2-A1 eingebracht. CHS-1 ist eine Chitinsynthase, welche vor allem im Kern des Spitzenkörpers lokalisiert und sich daher gut als Spitzenkörper-Marker eignet (Sanchez-Leon *et al.*, 2011) (vgl. EL, Abschnitt 1.3.1). Der CHS-1-GFP exprimierende  $\Delta bem-1$  Stamm wurde als 2-CG-6 bezeichnet. Im Vergleich zum entsprechenden Wildtyp-Stamm CG-12 (vgl. EG, Abschnitt 3.4.6) konnten keine Abnormalitäten bezüglich der Lokalisierung und der Dynamik des Spitzenkörpers in wachsenden reifen Hyphen festgestellt werden (Abb. 3.47, A+B).

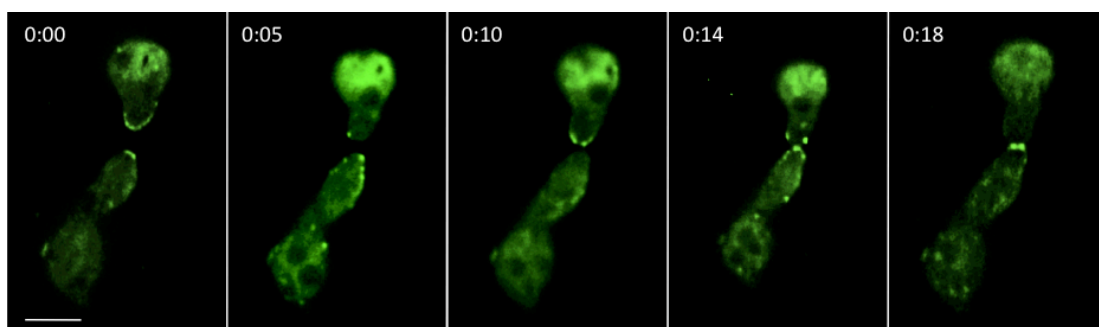


**Abb. 3.47: Die Chitin-Synthase CHS-1 zeigt kein abnormales Lokalisierungsmuster in der  $\Delta bem-1$  Mutante.** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von CHS-1-GFP exprimierenden reifen Hyphen des Wildtyps (A, Stamm CG-12) und der  $\Delta bem-1$  Mutante (B, Stamm 2-CG-6) sowie eines CHS-1-GFP exprimierenden  $\Delta bem-1$  Keimlings (C, Stamm 2-CG-6). Epifluoreszenzmikroskopische Aufnahmen. Größenbalken = 5  $\mu$ m.

In Araujo-Palomares *et al.* wurde beschrieben, dass ein Spitzenkörper in jungen Wildtyp-Keimlingen nicht vorhanden ist und sich dieser erst in reiferen Keimlingen ausbildet, welche eine Keimschlauchlänge von mindestens 40  $\mu$ m erreicht haben (Araujo-Palomares *et al.*, 2009). An den Keimschlauchspitzen von jungen  $\Delta bem-1$  Keimlingen konnte ebenfalls keine Akkumulation von CHS-1 detektiert werden (Abb. 3.47, C). Dies deutet darauf hin, dass ebenso wie in jungen Wildtyp-Keimlingen in den jungen  $\Delta bem-1$  Keimlingen noch kein Spitzenkörper gegenwärtig ist. Die  $\Delta bem-1$  Keimlinge haben trotz ihrer Größe offensichtlich noch nicht den entsprechenden Reifegrad, um einen Spitzenkörper von detektierbarer Größe zu bilden.

### 3.9. Untersuchung der subzellulären Lokalisation der MAPKK STE-7 während der Keimlingsfusion

Wie bereits gezeigt wurde, gibt es einen Zusammenhang zwischen BEM-1 und der Aktivierung der MAP Kinase MAK-2 (Fus3p) während der Keimlingsfusion in *N. crassa*. In *S. cerevisiae* wird Fus3p durch seine übergeordnete MAP Kinase Kinase Ste7p aktiviert (vgl. EL, Abschnitte 1.2 und 1.4). Das Protein STE-7 (NCU04612) wurde in *N. crassa* als Ste7p-Homolog identifiziert. Ähnlich wie MAK-2 ist es sowohl für die Keimlings- als auch für die Hyphenfusion essentiell (Fleissner *et al.*, 2008, Maerz *et al.*, 2008). Ausgehend von der Beobachtung, dass die Rekrutierung von MAK-2 während der Keimlingsfusion an den Spitzen fusionierender *N. crassa* Keimlinge entgegengesetzt oszillatorisch erfolgt (Fleissner *et al.*, 2009b), stellte sich die Frage, ob STE-7 in gleicher Weise oszillatorisch rekrutiert wird. Um diese Frage beantworten zu können, wurde der ORF von *ste-7* mit den Primern 135 und 136 ausgehend von genomischer DNA amplifiziert und über *Xba*I und *Pac*I in den Vektor pMF272 kloniert. Das resultierende Plasmid pSte7-gfp-13, welches das *Pccg-1* getriebene *ste-7-gfp* enthält, wurde anschließend in den Wildtyp-Stamm N1-03 transformiert. Der Stamm Ste7G-13 zeigte nach Aufreinigung durch Einzelsporisolation ein starkes GFP-Signal. Eine fluoreszenzmikroskopische Analyse von gerichtet wachsenden Ste7G-13 Keimlingen zeigte deutlich einen oszillatorischen Wechsel in der Rekrutierung von STE-7-GFP an den Zellspitzen (Abb. 3.48).



**Abb. 3.48: STE-7-GFP oszilliert während der gerichteten Keimlingsinteraktion an den Zellspitzen beider Partner.** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von gerichtet wachsenden Keimlingen (Stamm Ste7G-13) im zeitlichen Verlauf. Deconvolierte Bilderstapel. Zeit in h und min. Größenbalken = 5  $\mu$ m.



Der Wechsel zwischen dem Zustand der maximalen Rekrutierung an der Spitze des einen Partners und dem Zustand der maximalen Rekrutierung an der Spitze des entgegengesetzten Partners erfolgte in einem zeitlichen Abstand von ca. 5-6 min. Nachdem der Zell-Zell-Kontakt zwischen den interagierenden Keimlingen hergestellt war, akkumulierte STE-7-GFP an der sich bildenden Fusionspore (Abb. 3.48). Sowohl die Dynamik des oszillatorischen Wechsels im zeitlichen Verlauf als auch die spätere Akkumulierung an der Fusionspore waren vergleichbar mit dem, was Fleissner *et al.* für MAK-2 beobachteten (Fleissner *et al.*, 2009b). Dies könnte darauf hindeuten, dass die MAP Kinase MAK-2 und ihre übergeordnete MAP Kinase Kinase STE-7 in einem gemeinsamen Komplex während der gerichteten Keimlingsfusion in *N. crassa* rekrutiert werden.

# Diskussion

## 4.1 BEM-1 ist entbehrlich für die Ausbildung und Aufrechterhaltung genereller Hyphenpolarität in *N. crassa*

In *S. cerevisiae* ist Bem1p ein wesentlicher Faktor für die Ausbildung von Zellpolarität während der Knospung. Darüber hinaus ist es essentiell für die Polarisierung der Zellen während der Paarung und gilt daher als zentraler Bestandteil der Zellpolaritätsmaschinerie (Chenevert *et al.*, 1992, Chenevert *et al.*, 1994).

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass BEM-1 in *N. crassa* einen wesentlichen Einfluss auf die vegetative Keimlings- bzw. Hyphenfusion und die Bildung der Makrokonidien hat. Im Gegensatz dazu sind weder die Aufrechterhaltung einer stabilen Polaritätsachse während der Verlängerung der Hyphenspitzen noch die sexuellen Paarungspartner-Interaktionen noch die Bildung der Mikrokonidien oder die Ausbildung von Zellpolarität während der Konidiosporenkeimung in der  $\Delta$ *bem-1* Mutante betroffen. Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass Polaritätsmaschinerien verschiedener molekularer Zusammensetzung zu den unterschiedlichen Polaritätsereignissen im Lebenszyklus von *N. crassa* beitragen könnten.

Die weit verbreitete Hypothese, dass die Mechanismen und Faktoren zur Ausbildung von Zellpolarität während der Hefeknospung in ihren wesentlichen Bestandteilen mit denen der Konidiosporenkeimung filamentöser Pilze identisch sind (Momany, 2002), steht im Widerspruch zu den hier beobachteten Tatsachen. Während Bem1p in *S. cerevisiae* für die Knospung substantiell ist, wird sein Homolog BEM-1 in *N. crassa* bei der Ausbildung der Zellpolarität während der Konidiosporenkeimung vermutlich durch andere Proteine in seiner Funktion teilweise oder vollständig ersetzt. Dies ist offenbar in anderen filamentösen Pilzen auch der Fall. Untersuchungen von Deletionsmutanten homologer Proteine in *A. nidulans* (Leeder & Turner, 2008) und *E. festucae* (Takemoto *et al.*, 2011) ließen ebenfalls keine Auswirkungen von BEM-1 auf die Ausbildung von Zellpolarität während der Sporenkeimung erkennen. Es zeigten sich lediglich schwache Defekte in der Aufrechterhaltung der Polarität reifer vegetativer Hyphen, welche sich in leichten Schwellungen an den Hyphenspitzen äußerten.

Durch die vorliegende Arbeit wurde gezeigt, dass BEM-1 in *N. crassa* weder für die Ausbildung von Polarität noch für deren Aufrechterhaltung während des vegetativen Hyphenwachstums essentiell ist. Die Lokalisierung von BEM-1-GFP an wachsenden Spitzen von Keimlingen und reifen Hyphen lässt jedoch vermuten, dass BEM-1 in *N. crassa* dennoch Teil einer konservierten Polaritätsmaschinerie ist. Ebenso dafür sprechen die vergrößerten Konidiosporen der  $\Delta b e m - 1$  Mutante sowie die deutlichen Zellpolaritätsdefekte, welche das lange *Pccg-1-bem-1-gfp* Konstrukt hervorruft.

Zusätzlich zur Lokalisation an den Hyphenspitzen wurde BEM-1-GFP an Septen und an der Fusionspore von fusionierten Keimlingen detektiert. FRAP-Analysen zeigten, dass sich die Rekrutierungskinetik von BEM-1 verglichen mit der von CHS-1 durch eine signifikant höhere Dynamik auszeichnete. Die Chitin-Synthase CHS-1 ist ein Vesikel-gebundenes Protein (Sanchez-Leon *et al.*, 2011). Eine höhere Dynamik von BEM-1 könnte auf Rekrutierungsmechanismen hindeuten, welche Vesikel-unabhängig sind und vermutlich darauf beruhen, BEM-1 aus einem zytoplasmatischen Pool zu rekrutieren.

Ähnlich wie BEM-1 in *N. crassa* wurde das entsprechende Homolog BemA in *E. festucae* ebenso an Hyphenspitzen und Septen detektiert (Takemoto *et al.*, 2011). Die Funktion, welche BEM-1 an den Septen übernimmt, ist bisher ungeklärt. Zusammen mit einer zunehmenden Zahl an Berichten über andere Proteine, welche in diversen filamentösen Pilzen sowohl an Hyphenspitzen als auch an Septen lokalisieren, spricht das beobachtete Lokalisierungsmuster von BEM-1 dafür, dass beide subzellulären Bereiche funktionelle Ähnlichkeiten aufweisen. Berichte über die Lokalisation von Komponenten des Exocysts an Hyphenspitzen und Septen stammen aus Studien an *N. crassa* und *Aspergillus oryzae* (Beltrán-Aguilar *et al.*, 2009, Hayakawa *et al.*, 2011). Der Exocyst ist ein Proteinkomplex, welcher die gerichtete Exozytose reguliert (Lipschutz & Mostov, 2002, Read, 2011). Ein Großteil der Proteine, die an Hyphenspitzen und Septen detektiert wurden, ist direkt an der Organisation von Zellpolarität und Zytoskelett beteiligt: der Rho-GTPase-Aktivator LRG-1 (Vogt & Seiler, 2008), Homologe des Formins Bni1p (Lichius *et al.*, 2012, Sharpless & Harris, 2002), das Aktin-Bindeprotein BUD-6 (Lichius *et al.*, 2012) sowie der GEF CDC-24, das RAC-1-Homolog RacA und der NADPH-Oxidase-Regulator NoxR (Takemoto *et al.*, 2011). Die Detektion von Komponenten des Mikrotubuli-organisierenden Zentrums (*microtubuli organizing center*, MTOC) an Hyphenspitzen

und Septen von *A. nidulans* könnte darauf hindeuten, dass Septen möglicherweise als Fixpunkte für die Organisation des Tubulin-Zytoskeletts dienen (Zekert *et al.*, 2010). Diverse Berichte über Zellpolaritäts- und Zytoskelett-organisierende Komponenten an Septen filamentöser Pilze könnten darauf hindeuten, dass das am Septum lokalisierende BEM-1 möglicherweise funktionell mit diesen Komponenten interagiert.

In *A. nidulans* ist das Bem1p-Homolog BemA für die korrekte Lokalisierung von SepA (Bni1p) essentiell. SepA ist sowohl mit dem Polarisom als auch mit dem Spitzenkörper assoziiert (Sharpless & Harris, 2002). Dies führte zu der Vermutung, dass BEM-1 möglicherweise auch in *N. crassa* eine Rolle bei der Organisation von Polarisom und Spitzenkörper übernimmt (Leeder & Turner, 2008). Beide Strukturen haben bei der Ausbildung und Aufrechterhaltung von Zellpolarität in filamentösen Pilzen eine herausragende Bedeutung (Harris, 2006, Harris & Momany, 2004) (vgl. EL, Abschnitt 1.3.1). Die Untersuchungen der subzellulären Lokalisierung der Polarisomkomponente SPA-2 und des Spitzenkörpermarkers CHS-1 in der  $\Delta bem-1$  Mutante zeigten jedoch, dass BEM-1 kein genereller Organisator beim Aufbau dieser Zellpolaritätskomplexe in *N. crassa* ist.

Die vegetativen  $\Delta bem-1$  Hyphen von *N. crassa* zeigten somit weder morphologische noch subzelluläre Veränderungen, welche auf einen Polaritätsdefekt hinweisen würden. Lediglich das verringerte lineare Hyphenwachstum der  $\Delta bem-1$  Mutante lässt erkennen, dass BEM-1 die Prozesse des polaren Hyphenwachstums positiv verstärkt. Möglicherweise ist diese positive Verstärkung in erster Linie ein direkter Effekt der molekularen Wirkungsweise an der Hyphenspitze. Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, dass sie ein Sekundäreffekt davon ist, dass BEM-1 die vegetative Keimlings- und Hyphenfusion fördert. Für letzteres spricht, dass grundsätzlich alle bisher beschriebenen Keimlings- bzw. Hyphenfusionsmutanten in *N. crassa* deutliche Defekte bezüglich des linearen Hyphenwachstums aufweisen (Fleissner *et al.*, 2005, Fu *et al.*, 2011, Pandey *et al.*, 2004, Simonin *et al.*, 2010, Xiang *et al.*, 2002).

Studien an *S. cerevisiae* deuten vermehrt darauf hin, dass zwei positive Rückkopplungs-Mechanismen parallel an der Ausbildung und Aufrechterhaltung von Zellpolarität beteiligt sind (vgl. EL, Abschnitt 1.5.1). Einer dieser Mechanismen ist

abhängig von einem funktionierenden Bem1p, der andere benötigt ein intaktes Aktin-Zytoskelett (Houk *et al.*, 2009, Howell *et al.*, 2009, Wedlich-Soldner & Li, 2003, Wedlich-Soldner *et al.*, 2004). Der erste Rückkopplungs-Mechanismus besteht darin, dass aktiviertes Cdc42p-GTP zytosolisches Bem1p lokal an die Plasmamembran rekrutiert. Hierdurch gelangt das mit Bem1p interagierende Cdc24p an diese Stelle, um dort weiteres Cdc42p zu aktivieren. Der zweite Mechanismus stellt sich so dar, dass aktiviertes Cdc42p-GTP zur Ausbildung von Aktin-Kabeln führt, welche die örtliche Rekrutierung von Vesikel-gebundenem Cdc42p fördern. In filamentösen Pilzen hängt das Hyphenwachstum in hohem Maße von einem hoch polarisierten Zytoskelett ab (Harris, 2006, Harris & Momany, 2004). Daher sind für das generelle Spitzenwachstum einer Pilzhyphe positive Zytoskelett-basierte Rückkopplungs-Mechanismen vermutlich von größerer Bedeutung als solche, die auf löslichen Signalmolekülen wie BEM-1 basieren. Letztere sollten dementsprechend eher entbehrlich für diesen Prozess sein und dürften vermutlich eine größere Bedeutung für die Modulierung dynamischerer Zellpolaritäts-Prozesse haben. Diese Hypothese ist konsistent gegenüber der Tatsache, dass BEM-1 in filamentösen Pilzen keine erheblichen Auswirkungen auf die Ausbildung und Aufrechterhaltung einer stabilen Polaritätsachse hat, das dynamische, gerichtete Wachstum in der *N. crassa*  $\Delta$ bem-1 Mutante jedoch deutlich beeinträchtigt ist. Die Inhibierung des Tubulin-Zytoskeletts hat in Wildtyp-Sporen einen genau gegenteiligen Effekt (Roca *et al.*, 2010). Während die auf Benomyl-haltigem Medium keimenden Sporen nicht in der Lage sind eine nachhaltig stabile Polaritätsachse zu bilden, sind Fusionen zwischen den Sporen durch kurze, gerichtet wachsende CATs nahezu uneingeschränkt möglich.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen zusammen mit denen von Roca *et al.* demnach vermuten, dass auch *N. crassa*, ähnlich wie *S. cerevisiae*, zwei unterschiedliche Wege zur Polaritätsverstärkung einspannt: zum einen den weniger dynamischen Zytoskelett-basierten Weg zur Ausbildung und Aufrechterhaltung einer rigiden Polaritätsachse, zum anderen einen durch schnell diffundierendes BEM-1 zur flexiblen Gestaltung von gerichteten Interaktionen.

## 4.2 BEM-1 ist notwendig für die Regulierung der Zellpolarität während der Makrokonidienbildung

Die Bildung der Makrokonidien in *N. crassa* zeichnet sich durch wiederholte apikale Knospung aus. Wesentlich hierfür ist die Koordinierung des permanenten Wechsels zwischen polarem und apolarem Wachstum. Die Mechanismen, die diesem Prozess zugrunde liegen, zeigen deutliche Gemeinsamkeiten mit denen der Zellteilung in *S. cerevisiae* (Springer, 1993, Springer & Yanofsky, 1989) (vgl. EL, Abschnitt 1.3.3). Ähnlich der vergrößerten, vielkernigen Zellen der *S. cerevisiae*  $\Delta bem-1$  Mutante (Chenevert *et al.*, 1992), führt eine *bem-1* Deletion in *N. crassa* zu einer Vergrößerung der Konidiosporen, welche mit einer Erhöhung der Anzahl der Zellkerne pro Spore einhergeht. Diese phänotypischen Ähnlichkeiten deuten darauf hin, dass BEM-1 in *N. crassa* eine Funktion übernimmt, welche analog zu der von Bem1p in *S. cerevisiae* ist. Zahlreiche Studien an *S. cerevisiae* führten bereits zu einem in weiten Teilen schlüssigen Modell, welches die Mechanismen der Ausbildung von Zellpolarität während der Zellteilung beschreibt (Chant, 1994, Slaughter *et al.*, 2009, Wendland, 2001) (vgl. EL, Abschnitt 1.5.1.1). Während der frühen G1-Phase bindet Zellzyklus-abhängig das Cyclin2 (Cln2p) an die Cdk Cdc28p, welche dadurch aktiviert wird (Lew & Reed, 1995, Pruyne & Bretscher, 2000). Cdc28p aktiviert daraufhin die kleine Ras GTPase Rsr1p/Bud1p, welche sich in haploiden Hefezellen membrangebunden in nächster Nähe zu der vorherigen Knospennarbe befindet (Pruyne & Bretscher, 2000). Aktiviertes Rsr1p rekrutiert lokal Cdc24p, welches wiederum Cdc42p in seine aktive GTP-gebundene Form umwandelt (Chant & Stowers, 1995). Die auf diese Weise entstandene Ansammlung von aktivem Cdc42p wird effektiv durch einen ternären Proteinkomplex bestehend aus einer p21-aktivierten Kinase (Pak), Bem1p und Cdc24p mittels eines positiven Rückkopplungs-Mechanismus verstärkt (Atkins *et al.*, 2008, Kozubowski *et al.*, 2008) (vgl. EL, Abschnitt 1.5.1.1; DK, Abschnitt 4.1). Dieser Pak-Bem1p-Cdc24p-Komplex bindet über die Pak an aktiviertes Cdc42p-GTP und rekrutiert somit Cdc24p an diese Stelle, welches dafür sorgt, dass weiteres Cdc42p in seine aktive Form umgewandelt wird. Fehlt Bem1p, erfolgt die Konzentration von Cdc42p an der vorgesehenen Stelle des zellulären Kortex und damit die Ausbildung einer Polaritätsachse mit zeitlicher Verzögerung (Irazoqui *et al.*, 2003, Wedlich-Soldner *et al.*, 2004). Die hierdurch verlängerte Phase isotropen Wachstums bewirkt, dass die  $\Delta bem-1$  Zellen im Vergleich zum Wildtyp vor ihrer Teilung in ihrer Größe erheblich zunehmen (Chenevert *et al.*, 1992, Slaughter *et al.*, 2009). Die in dieser

Arbeit beschriebenen Defekte in der Makrokonidien-Bildung der  $\Delta bem-1$  Mutante lassen vermuten, dass BEM-1 in *N. crassa* bei diesem Prozess eine zu Bem1p analoge Funktion übernimmt und über einen positiven Rückkopplungs-Mechanismus für eine effiziente sukzessive Zellpolarisierung sorgt. BEM-1 ist demnach vermutlich Teil einer Polaritätsmaschinerie, die unter Hefen und filamentösen Pilzen zumindest partiell konserviert zu sein scheint. Zu klären bleibt jedoch, ob BEM-1 in *N. crassa* ebenso wie in *S. cerevisiae* funktional mit Cdc42p, Cdc24p und einer Pak zusammenhängt, oder ob andere Faktoren die Rollen der Interaktionspartner übernehmen. Im Gegensatz zu *S. cerevisiae* besitzen filamentöse Pilze zusätzlich zu CDC-42 ein RAC-1-Homolog (Harris, 2011). Sowohl Regulatoren als auch Effektoren von CDC-42 und RAC-1 unterscheiden sich jedoch von Spezies zu Spezies. Eine Deletion von *bem-1* im Basidiomyceten *U. maydis* führte wie in *S. cerevisiae* und *N. crassa* zu deutlich vergrößerten Zellen (Alvarez-Tabares & Perez-Martin, 2008). Ebenso wie in *S. cerevisiae* interagiert BEM-1 in *U. maydis* mit CDC-24 und CLA-4 (Pak). Die Bildung dieses ternären Komplexes führt in *U. maydis* jedoch nicht zu einer Aktivierung von CDC-42, sondern zu der von RAC-1, da CDC-24 in dieser Spezies ein RAC-1-spezifischer GEF ist (Frieser *et al.*, 2011). CDC-42 hingegen wird spezifisch durch den GEF DON-1 aktiviert (Hlubek *et al.*, 2008). Kozubowski *et al.* zeigten, dass ein Fusionsprotein aus Cla4p und Cdc24p in *S. cerevisiae* die Zellpolaritäts-Defekte einer *bem-1* Deletion komplementierte (Kozubowski *et al.*, 2008). Dies zeigt deutlich, dass die Funktion von Bem1p während der Ausbildung von Zellpolarität auf seine Funktion als molekularer Adapter zwischen Cla4p und Cdc24p zu reduzieren ist. Durch die Einführung ähnlicher Fusionskonstrukte in die *N. crassa*  $\Delta bem-1$  Mutante sollte sich leicht testen lassen, welche Rho-GTPase (CDC-42/RAC-1) bzw. welcher GEF (CDC-24/DON-1) und welche Pak (CLA-4/STE-20) während der Regulierung der Zellpolarität mit BEM-1 funktionell interagieren.

In *N. crassa* weist nicht nur die Bildung der Makrokonidien, sondern auch die der Mikrokonidien gewisse morphologische Ähnlichkeiten zur Knospung in *S. cerevisiae* auf (Springer, 1993, Springer & Yanofsky, 1989) (vgl. EL, Abschnitt 1.3.3). Angesichts der starken Defekte der  $\Delta bem-1$  Mutante in der Makrokonidienbildung wurde vermutet, dass die Mikrokonidienbildung ebenso gestört sein würde. Diese Vermutung wurde nicht bestätigt. Während der sukzessiven apikalen Knospung von spezialisierten Lufthyphen zur Bildung neuer Makrokonidien-Vorläuferzellen muss

das zelluläre Programm in jedem Zyklus erneut von isotropem Wachstum zu polarem Wachstum umgeschaltet werden. Demgegenüber ist die laterale Knospung zur Bildung der Mikrokonidien innerhalb des thallusartig wachsenden Hyphengeflechts eher vergleichbar mit einer sukzessiven Abschnürung von Zellmaterial an der Spitze eines polar wachsenden Seitenzweiges. Ein Wechsel zwischen isotropem und polarem Wachstum findet hier vermutlich nicht statt. Dies lässt vermuten, dass aufgrund dieses Unterschieds die Zellpolarität in beiden Prozessen verschiedenartig reguliert wird. Diese Hypothese steht im Einklang mit der Beobachtung, dass BEM-1 während der Makrokonidienbildung eine bedeutende Rolle spielt, während ein Fehlen von BEM-1 keine Auswirkungen auf die Mikrokonidienbildung hat.

Im Vergleich zum Wildtyp war die Keimung der  $\Delta bem-1$  Konidiosporen trotz der morphologischen Defekte weder reduziert noch zeitlich verzögert. Denkbar ist, dass auch die Konidiosporen von *N. crassa* primär den Zytoskelett-basierten sekretorischen Weg zur Ausbildung der Zellpolarität nutzen und daher bei der Keimung nicht auf BEM-1 angewiesen sind. Diese Hypothese ist konsistent gegenüber der Beobachtung, dass die Bildung von Keimschläuchen durch die Inhibierung des Tubulin-Zytoskeletts in Gegenwart von Benomyl verhindert wird (Roca *et al.*, 2010). Intakte Mikrotubuli sind folglich essentiell für die Keimschlauchbildung, möglicherweise da sie zur Beförderung von Vesikel-gebundenen Polaritätskomponenten benötigt werden. Das im Zytoplasma diffundierende Polaritätsprotein BEM-1 spielt bei diesem Prozess offensichtlich keine wesentliche Rolle.

Die Analyse von *S. cerevisiae* Mutanten hat gezeigt, dass Hefezellen auch in Abwesenheit von internen oder externen Stimuli in der Lage sind spontan zu polarisieren. Dieser Prozess wird als „Brechen der Symmetrie“ (*symmetry breaking*) bezeichnet (Slaughter *et al.*, 2009, Sohrmann & Peter, 2003) (siehe EL, Abschnitt 1.5.1.1). Wesentlich hierfür ist die Konkurrenz von Polaritäts-Clustern um ein hoch dynamisches Bem1p, welches sich im permanenten Wechsel zwischen Membranlokalisierung und zytosolischer Diffusion befindet (Butty *et al.*, 2002, Goryachev & Pokhilko, 2008). Wird eine Rekrutierung von Bem1p an die Plasmamembran künstlich verlangsamt, führt dies verstärkt zur Ausbildung von multiplen Polaritätsachsen (Houk *et al.*, 2009, Howell *et al.*, 2009) (vgl. EL,



Abschnitt 1.5.1.1). Ähnlich gestört zeigten sich *N. crassa* - Sporen, welche ein BEM-1 mit künstlich verlängertem N-terminus enthielten und dadurch zur vermehrten Bildung von Keimschläuchen tendierten. Denkbar ist, dass das künstlich verlängerte BEM-1 in *N. crassa* zu einer verzögerten Diffusionsgeschwindigkeit führt, welche den Wechsel zwischen Plasmamembran-Rekrutierung und Ablösung verzögert. Diese Art von Behinderung bewirkt möglicherweise die Ausbildung multipler Polaritätsachsen während der Makrokonidienkeimung und während des Wachstums reifer vegetativer Hyphen. Ob diese Hypothese konsistent ist und das lange BEM-1 tatsächlich eine langsamere Membran/Zytoplasma-Austauschgeschwindigkeit aufweist, ließe sich vermutlich durch ein FRAP-Experiment (Berkovich *et al.*, 2011) klären. Das lange und das kurze BEM-1 müssten hierbei am C-terminus farblich unterschiedlich markiert werden. Zudem wäre es nötig das stromabwärts gelegene zweite ATG der langen Sequenz zu mutieren, um eine Expression der kurzen Proteinversion durch dieses Konstrukt zu verhindern. Alternativ könnte der künstlich verlängerte N-terminus in BEM-1 eine Konformationsänderung auslösen, welche das Protein möglicherweise physiologisch verändert. Studien von Leeuw *et al.* deuten darauf hin, dass Bem1p von *S. cerevisiae* in einer phosphorylierten und einer nicht phosphorylierten Form existiert (Leeuw *et al.*, 1995). Han *et al.* konnten dies bestätigen und wiesen eine Phosphorylierungs-Stelle an Ser72 nach, welche sich direkt vor der N-terminalen SH3a-Domäne befindet (Han *et al.*, 2005). Diese Daten lassen vermuten, dass Bem1p in einer inaktiven und einer aktiven Form in der Zelle vorliegt. Denkbar ist, dass Bem1p nur in seiner aktivierten Form die Zellpolarität positiv verstärkt. Der künstliche N-terminus des *N. crassa* BEM-1 bewirkt möglicherweise eine Konformationsänderung, welche das Protein in eine konstitutiv aktive Form umwandelt. Diese permanent aktive Proteinversion könnte dementsprechend zur unkontrollierten Verstärkung der Zellpolarität führen, wodurch sich der beobachtete Phänotyp erklären ließe. Eine weitere attraktive Hypothese ist, dass ein langes funktionsgestörtes BEM-1 durch die Bindung an seine Interaktionspartner diese in ihrer Funktion behindern könnte. Ähnliches postulierten Leeder und Turner um einen Erklärungsansatz dafür zu bieten, wie in *A. nidulans* die alleinige Expression der N-terminalen SH3-Domäne in der  $\Delta bemA$ -Muante ( $\Delta bem-1$ ) signifikant die Sporenkeimung behindert (Leeder & Turner, 2008). In *N. crassa* komplementierte das lange *Pccg-1-bem-1-gfp* Konstrukt trotz starker Effekte auf die Zellpolarität die Ascosporen-Lethalität und die Defekte im gerichteten Wachstum einer  $\Delta bem-1$

Mutante. Diese Beobachtungen könnten darauf hindeuten, dass BEM-1 mit verschiedenen Komponenten unterschiedlicher molekularer Polaritätsmaschinerien interagiert.

Abschließend lässt sich an dieser Stelle festhalten, dass BEM-1 in *N. crassa* für die Ausbildung und Aufrechterhaltung genereller Hyphenpolarität entbehrlich ist. Klare Indizien deuten jedoch darauf hin, dass es mit Komponenten der Zellpolaritätsmaschinerie interagiert. Hierfür sprechen vor allem die Defekte in der Makrokonidienbildung und die Auswirkungen eines künstlich verlängerten BEM-1.

#### **4.3 BEM-1 ermöglicht effizientes Interagieren zwischen potentiellen Fusionspartnern während der vegetativen Zell-Fusion**

Nicht nur die Makrokonidienbildung, sondern auch die Keimlings- und Hyphenfusion sind in der *N. crassa*  $\Delta bem-1$  Mutante stark beeinträchtigt. Während die Makrokonidienbildung, wie bereits erläutert, starke Ähnlichkeiten zur Knospung in *S. cerevisiae* aufweist, gibt es deutliche Parallelen zwischen der Keimlingsfusion und der Paarung haploider Hefezellen (Fleissner *et al.*, 2008). Interessanterweise hängt sowohl die Knospung als auch die Paarung in *S. cerevisiae* stark von Bem1p ab (Chenevert *et al.*, 1992, Chenevert *et al.*, 1994, Lyons *et al.*, 1996, Moskow *et al.*, 2000). Dies deutet darauf hin, dass *S. cerevisiae* und *N. crassa* eine konservierte Polaritätsmaschinerie in beiden Prozessen verwenden.

Bei der Hefe-Paarung dient Bem1p als Gerüstprotein, welches das MAP Kinase Modul des Pheromon-Antwort-Signalweges mit den Hauptbestandteilen der Polaritätsmaschinerie verbindet (Leeuw *et al.*, 1995, Lyons *et al.*, 1996). Dies führt dazu, dass die MAP Kinase Fus3p an die Spitzen der *Shmoos* rekrutiert wird (van Drogen *et al.*, 2001) (vgl. EL, Abschnitt 1.4). Während der Keimlingsfusion in *N. crassa* wird MAK-2 (Fus3p) ebenso an die Spitzen der fusionierenden Zellen rekrutiert. Hier geschieht dies jedoch in einer dynamisch oszillierenden Art und Weise. Die Rekrutierung an die Spitzen beider Partner erfolgt genau gegenläufig um eine halbe Phase versetzt (Fleissner *et al.*, 2009b). Dieser hoch regulierte Prozess involviert vermutlich positive und negative Rückkopplungs-Mechanismen. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen vermuten, dass diese Mechanismen zum Teil von BEM-1 abhängen. Die

gerichteten Interaktionen der  $\Delta bem-1$  Keimlinge sind stark reduziert und zeitlich verzögert. Darüber hinaus erfolgen sie lediglich über kurze Distanzen, sind instabil und äußerst sensitiv gegenüber experimenteller Manipulation. Das SO-Protein zeigte sich in Keimlingen, deren gerichtete Interaktionen noch während des Präparierens für die mikroskopische Analyse zum Erliegen kamen, in einer auffälligen Weise mislokalisiert. Anstelle einer wechselseitig oszillierenden Rekrutierung, wie sie in interagierenden Wildtyp-Keimlingen zu beobachten ist, lokalisierte es zur gleichen Zeit in beiden Partnern und verteilte sich über die gesamte Plasmamembran beider Zellen. Das exakt gleiche Lokalisierungs-Muster zeigte sich nach spezifischer Inhibierung der MAP Kinase MAK-2 (Fleissner *et al.*, 2009b), was darauf hindeutet, dass der MAK-2 Signalmechanismus in  $\Delta bem-1$  instabil ist. In *S. cerevisiae* führt das Fehlen von Bem1p zu einer deutlich reduzierten Sensitivität gegenüber dem  $\alpha$ -Faktor. Dies lässt vermuten, dass Bem1p eine effiziente Signalweiterleitung des aktivierten Pheromon-Rezeptors begünstigt (Kao *et al.*, 1996). Das zeitlich verzögerte Auftreten der Keimlingsfusionen in  $\Delta bem-1$  zusammen mit der zeitlich verzögerten Aktivierung von MAK-2 könnte auf eine ähnlich unterstützende Funktion von BEM-1 in *N. crassa* hindeuten. Im Einklang mit dieser Hypothese steht die Beobachtung, dass die gerichteten Interaktionen der  $\Delta bem-1$  Keimlinge stark beeinträchtigt sind und nur über kurze Distanzen stattfinden können. Zwei interagierende Keimschläuche, deren Spitzen sich durch hoch polarisiertes Wachstum permanent fortbewegen, benötigen einen effizienten Mechanismus, um über weite Distanzen flexibel auf das einkommende Signal des Partners zu reagieren und die Ausrichtung ihrer Polaritätsachsen kontinuierlich neu justieren zu können. Diese Art von Interaktionen konnte zwischen den  $\Delta bem-1$  Keimlingen nicht beobachtet werden. Es zeigten sich lediglich solche Interaktionen, die kein Umlenken einer bereits bestehenden Polaritätsachse erforderten und anstelle dessen zwischen zwei neu induzierten CATs aus unbeweglichen, dicht beeinander liegenden Sporen oder ortsfesten subapikalen Keimschlauch-Abschnitten hervorgegangen waren. Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass BEM-1 in *N. crassa* eine wesentliche Rolle dabei spielt, die Effizienz von gerichteten Interaktionen zwischen potentiellen Fusionspartnern während der vegetativen Zell-Fusion zu steigern. Wird davon ausgegangen, dass einerseits Zytoskelett-basierte und andererseits auf diffundierendem BEM-1 basierende Mechanismen additiv bei der Ausrichtung der Zellpolarität wirken, so sind letztere

vermutlich weitaus geeigneter, gerichtete, dynamisch flexible Interaktionen zu ermöglichen. Folglich erscheint es plausibel, dass die Keimlingsfusionen wesentlich stärker von BEM-1 abhängig sind als das ungerichtete polare Hyphenwachstum. Letzteres kommt nach Auflösung des Tubulin-Zytoskeletts zum Erliegen, während die gerichteten Keimlingsinteraktionen ungestört bleiben (Roca *et al.*, 2010). Das Fehlen von BEM-1 führt zu einem genau entgegengesetzten Effekt.

Kolokalisierungsstudien mit dsRED-BEM-1 und MAK-2-GFP ergaben, dass beide Proteine in der fortgeschrittenen Keimlingsfusion einen transienten Ring an der sich öffnenden Fusionspore bilden. Die Untersuchungen von MAK-2-GFP in der  $\Delta bem-1$  Mutante zeigten jedoch, dass MAK-2-GFP auch in Abwesenheit von BEM-1 an die Fusionspore rekrutiert werden kann. Durch FRAP-Analysen an der Fusionspore wurde gezeigt, dass BEM-1 auch nach Herstellung des Zell-Zell-Kontakts rekrutiert wird. Die Fusions-Effizienz von  $\Delta bem-1$  Keimlingspaaren, welche bereits Zell-Zell-Kontakt hergestellt hatten, zeigte im Vergleich zum Wildtyp jedoch keine Beeinträchtigungen. Die Bedeutung der Rekrutierung von BEM-1 zur Fusionspore ist daher unklar. Fleissner *et al.* zeigten bereits, dass MAK-2-GFP an die sich öffnende Fusionspore rekrutiert wird (Fleissner *et al.*, 2009b). Ähnliches wurde in derselben Studie auch für SO-GFP beschrieben. Eine kürzlich veröffentlichte Studie zeigte zudem, dass die Polarisomkomponenten SPA-2, BUD-6 und BNI-I ebenso einen transienten Ring um die Fusionspore von fusionierenden Keimlingen ausbilden (Lichius *et al.*, 2012) (vgl. EL, Abschnitt 1.3.1). Diese Beobachtung deutet auf eine Funktion der Polaritätsmaschinerie zu einem späten Zeitpunkt der Keimlingsfusion hin. Möglicherweise dient die Polaritätsmaschinerie dazu, den exozytotischen Apparat an den Fusionspunkt bzw. die sich öffnende Pore zu dirigieren, damit über Vesikel-vermittelten Transport die benötigten Enzyme zur Umstrukturierung von Zellwand und Plasmamembran sowie Membranlipide und Membranproteine an diese Stelle gelangen können (Harris, 2006, Read, 2011, Steinberg, 2007). In *S. cerevisiae* interagiert das BEM-1 Homolog Bem1p mit Sec15p, einem Protein des Exozyst-Komplexes (France *et al.*, 2006, Lipschutz & Mostov, 2002). Diese Tatsache steht im Einklang mit der Hypothese, dass BEM-1 bei der Regulation des exozytotischen Apparats möglicherweise eine Rolle spielt.

#### 4.4 Verbindet BEM-1 ROS-basierte Signalmechanismen mit der Zellpolaritätsmaschinerie?

Über einen Zusammenhang von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS, *reactive oxygen species*) und der Regulierung von Zellpolarität in filamentösen Pilzen wird derzeit verstärkt diskutiert (Harris, 2008, Kawahara & Lambeth, 2007, Scott & Eaton, 2008, Semighini & Harris, 2008) (vgl. EL, Abschnitt 1.5.2). Bisher ist hierüber allerdings noch recht wenig bekannt.

BEM-1 gilt als ein potentieller Kandidat, welcher in filamentösen Pilzen möglicherweise an der Regulierung der Aktivität ROS-produzierender NADPH-Oxidase-Komplexe beteiligt ist (Aguirre & Lambeth, 2010, Kawahara & Lambeth, 2007, Scott & Eaton, 2008). Eine direkte physikalische Interaktion zwischen einem BEM-1 Homolog (BemA) und dem NoxR-Protein, welches für die Aktivierung von NADPH-Oxidasen essentiell ist, wurde kürzlich in *E. festucae* nachgewiesen (Takemoto *et al.*, 2011). Zudem zeigte sich, dass BemA zur Bildung eines stabilen NoxR-Komplexes an den Hyphenspitzen beiträgt. Diese Daten deuten darauf hin, dass BemA an der Aktivierung von NADPH-Oxidasen beteiligt ist und lassen eine direkte Verbindung zwischen ROS-generierenden Systemen und der Polaritätsmaschinerie vermuten. Zusammen mit den sich mehrenden Hinweisen über einen Zusammenhang zwischen BEM-1 und ROS-produzierenden NADPH-Oxidasen gaben die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit Anlass, den Einfluss von ROS-produzierenden Enzymen auf die vegetative Keimlingsfusion im phytopathogenen Pilz *Botrytis cinerea* zu untersuchen. Interessanterweise zeigte sich, dass sowohl die NADPH-Oxidase NoxA als auch der Regulator NoxR essentiell für Keimlingsfusionen in *B. cinerea* sind (Roca *et al.*, 2012). Auf diese Weise konnte erstmalig ein Zusammenhang zwischen ROS-generierenden Enzymsystemen und vegetativer Zellfusion in filamentösen Pilzen hergestellt werden. Die von Roca *et al.* gemachten Beobachtungen lassen vermuten, dass hierbei ROS-basierte Signalmechanismen eine Rolle spielen.

Obwohl die  $\Delta bem-1$  Keimlinge im Inkubator gerichtet miteinander interagierten, ließ sich das gerichtete Wachstum von  $\Delta bem-1$  Keimlingen während des Mikroskopierens nicht beobachten. Zur mikroskopischen Analyse befanden sich die Keimlinge entweder unter einem Deckgläschen oder in Flüssigmedium. NADPH-Oxidasen nutzen molekularen Sauerstoff als Substrat (Bedard & Krause, 2007). Bei niedrigem Sauerstoff-Partialdruck unter einem Deckgläschen oder in Flüssigmedium könnten

NADPH-Oxidasen mit einer hohen Sauerstoff-Affinität möglicherweise entscheidender für die gerichteten Keimlingsinteraktionen sein als bei höheren Sauerstoff-Partialdrücken während der Inkubation auf einer Agarplatte im Inkubator. Die beschriebenen Beobachtungen könnten darauf hindeuten, dass BEM-1 möglicherweise eine Sauerstoffaffinitäts-steigernde Wirkung auf NADPH-Oxidasen hat. Ähnlich wie Hämproteine binden NADPH-Oxidasen molekularen Sauerstoff mit Hilfe eines Eisenzentrums (Bedard & Krause, 2007). Vom menschlichen Hämoglobin sind regulatorische Mechanismen der Sauerstoffaffinitäts-Modulierung bekannt (Adamson & Finch, 1975, Bellingham, 1976). Durch Anreichern des Inkubationsmediums mit Sauerstoff konnte der Fusionsdefekt der  $\Delta bem-1$  Keimlinge nicht aufgehoben werden. Diese Beobachtung scheint der Hypothese zur Sauerstoffaffinitäts-steigernden Wirkung von BEM-1 auf NADPH-Oxidasen gegenüber zu stehen. Die Anreicherung von Sauerstoff im Medium geschah auf Basis einer Dismutation von  $H_2O_2$ . Da reaktive Sauerstoffspezies in gerichteten Keimlingsinteraktionen eine Rolle zu spielen scheinen, ist nicht auszuschließen, dass die Zugabe von  $H_2O_2$  die fein regulierten Prozesse der gerichteten Interaktionen stören können. Ein durch Zugabe von  $H_2O_2$  hervorgerufener negativer Effekt auf Keimlingsfusionen in *B. cinerea* wurde kürzlich durch Roca *et al.* beschrieben (Roca *et al.*, 2012).

Die in der vorliegenden Arbeit präsentierten Daten stehen demnach im Einklang mit der hier vorgeschlagenen Hypothese, dass BEM-1 ein mögliches Bindeglied ist, welches zwischen Zellpolaritätsmaschinerie und Regulation von ROS vermittelt. Die Deletion von *bem-1* führt zu Defekten im gerichteten Wachstum während der vegetativen Zell-Fusion. Dies könnte gemäß der soeben erläuterten Hypothese darauf zurückzuführen sein, dass die Kopplung von ROS-basierten Signalmechanismen mit Zellpolarität bei diesem Prozess möglicherweise eine wesentliche Bedeutung hat. Zusammen mit den weiter oben diskutierten Daten ergibt sich auf diesem Modell basierend die Hypothese, dass BEM-1 nicht nur zwischen Zellpolarität und Regulation von ROS vermittelt, sondern auch MAP Kinase-basierte Signalmechanismen in beide Systeme integriert und damit alle drei miteinander verbindet. Im Einklang mit dieser Hypothese steht, dass die *N. crassa* Mutanten  $\Delta bem-1$ ,  $\Delta mak-2$  und  $\Delta nor-1$  ( $\Delta noxr$ ) weitere charakteristische Phänotypen gemeinsam haben, wie z. B. die nicht keimungsfähigen sexuellen Nachkommen (Ascosporen) (Cano-Dominguez *et al.*,

2008). Studien an *Podospora anserina* lassen vermuten, dass zur Keimung von Ascosporen ein autonomer ROS-Impuls nötig ist, welcher die Ausbildung einer Polaritätsachse und damit die Bildung eines Keimschlauchs zur Folge hat (Malagnac *et al.*, 2004).

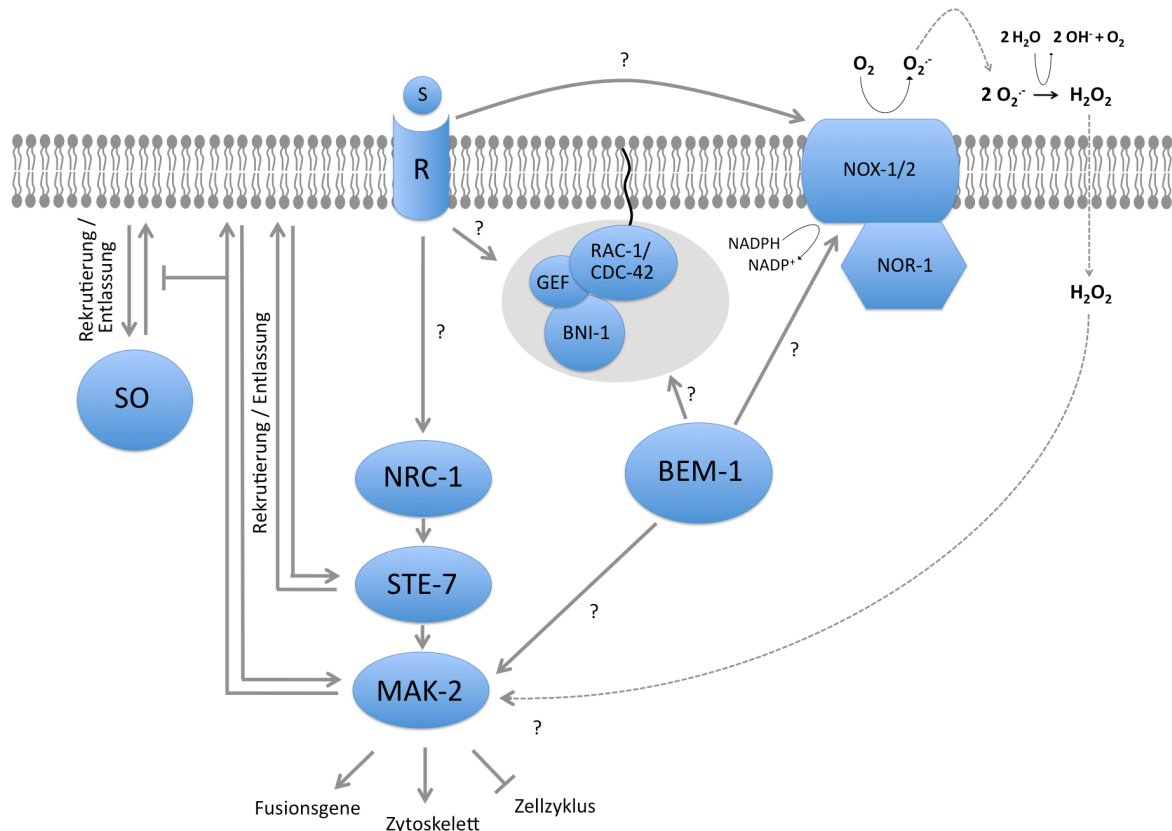
Einzellige Hefen weisen keine NADPH-Oxidasen auf. Eine mögliche Beteiligung von BEM-1 bei der Regulation von ROS in filamentösen Pilzen würde demnach gegenüber Hefen eine zusätzliche Funktion darstellen. Eine solche Funktion könnte eventuell darin bestehen, ROS-gesteuert die Aktivität von MAK-2 zu modulieren. Durch Zugabe von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> wird die Aktivität von MAK-2 in submerser Kultur induziert (Maerz *et al.*, 2008). Untersuchungen an diversen anderen Modellorganismen zeigten, dass Protein-Tyrosin-Phosphatasen durch reversible ROS-abhängige Oxidation von Cystein im katalytischen Zentrum inhibiert werden. Diese Modifikation erlaubt das Aktivieren und Potenzieren von Signalkaskaden (Bedard & Krause, 2007, Finkel, 2001, Lee *et al.*, 1998, Tonks, 2005, Wentworth *et al.*, 2011). Denkbar ist, dass auch in *N. crassa* während der Keimlingsfusion spezifische Phosphatasen ROS-abhängig inhibiert werden, was eine Aktivitätssteigerung der MAPK-Kaskade ermöglichen könnte. Die Tatsache, dass funktionales MAK-2 für die einwandfreie Delokalisierung von SO nötig ist, deutet darauf hin, dass eine Reaktivierung der zuvor resensibilisierten MAPK-Kaskade hierfür eine Voraussetzung ist (Fleissner *et al.*, 2009b). Die Ähnlichkeit des SO-Lokalisierungsmusters in der  $\Delta bem-1$  Mutante (EG, Abschnitt 3.6.3) mit der Situation in Wildtyp-Fusionspaaren, bei welchen MAK-2 inhibiert wurde (Fleissner *et al.*, 2009b), könnte darauf hindeuten, dass die Stimulierung der intrazellulären ROS-Produktion hierbei eine Rolle spielt. Eine sich daraus ergebene attraktive Hypothese ist, dass in interagierenden Keimlingen möglicherweise positive und/oder negative Rückkopplungs-Mechanismen unter Beteiligung von BEM-1 und ROS moduliert werden, welche die Aktivität und/oder Plasmamembran-Rekrutierung von MAK-2 und SO regulieren und somit eine effiziente Zell-Fusion zwischen genetisch identischen *N. crassa* - Keimlingen gewährleisten. Zu testen, ob das intrazelluläre Redox-Potenzial während der vegetativen Keimlingsinteraktion parallel mit der Rekrutierung bzw. Entlassung von MAK-2 und SO oszilliert, wäre ein erster Schritt sich dieser Hypothese zu nähern. Oszillierende intrazelluläre Konzentrationen der reaktiven Sauerstoffspezies H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ließen sich möglicherweise mit Hilfe von *live-cell*-Fluoreszenz-Mikroskopie

analysieren. Hierbei könnte sich ein Derivat des Fluoreszenzfarbstoffs H<sub>2</sub>DCFDA zur reversiblen Detektion von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> als geeignet erweisen (Cardenas *et al.*, 2008, Jakubowski & Bartosz, 2000). Alternativ mögen heterolog exprimierte Redox-Sensorproteine zur fluoreszenzmikroskopischen Detektion von ROS getestet werden (Niethammer *et al.*, 2009).



#### 4.5 BEM-1 - ein zentraler Modulator von Zellpolarität, MAPK-Signaltransduktion und ROS-Signaling? - ein Arbeitsmodell

Mit Hilfe der Daten, welche in der vorliegenden Arbeit präsentiert wurden, lässt sich folgendes Modell konstruieren (siehe Abb. 4.1).



**Abb. 4.1: Modell zur inter- und intrazellulären Signaltransduktion während der vegetativen Zell-Fusion in *N. crassa*.** Das Signalprotein BEM-1 dient möglicherweise als molekulares Bindeglied, welches die Zellpolaritätsmaschinerie mit MAP Kinase- und ROS-basierter Signaltransduktion koppelt. Die Zellpolaritätsmaschinerie ist grau hinterlegt. Sie ist durch das Formin BNI-1, die Rho-GTPasen RAC-1 und CDC-42 sowie durch einen GEF angedeutet. Eine *rac-1* Mutante wurde kürzlich in einem Mutantenscreening als fusionsdefekt identifiziert (Fu *et al.*, 2011). Das MAP Kinase-Modul besteht aus den Kinasen NRC-1, STE-7 und MAK-2. NOX-1 bzw. NOX-2 stellen zusammen mit ihrem Aktivator NOR-1 ein ROS-generierendes Enzymsystem dar, welches unter NADPH-Verbrauch Superoxid ( $O_2^-$ ) produziert.  $O_2^-$  dismutiert daraufhin sowohl spontan als auch enzymatisch gesteuert zum membrangängigen  $H_2O_2$  (Aguirre & Lambeth, 2010, Winterbourn & Hampton, 2008). R, unbekannter Rezeptor. S, unbekanntes Signalmolekül. Weitere Erläuterungen siehe Text.

Die Interaktion zwischen zwei *N. crassa* Keimlingen beginnt gemäß der derzeit anerkannten Hypothese mit der Bindung einer postulierten Signalsubstanz an einen

postulierten Rezeptor eines Fusionspartners (Fleissner *et al.*, 2009b). Der dadurch aktivierte Rezeptor sorgt vermutlich für eine Aktivierung des MAP Kinase-Moduls, was zur Rekrutierung von STE-7 (diese Arbeit) und MAK-2 (Fleissner *et al.*, 2009b) führt. Parallel interagiert der aktivierte Rezeptor möglicherweise mit der Zellpolaritätsmaschinerie und einer ROS-generierenden NADPH-Oxidase. Die Zellpolaritätsmaschinerie involviert vermutlich die Rho-GTPase RAC-1, einen GEF sowie das Formin BNI-1 und ist durch den hydrophoben Lipidanker der GTPase mit der Membran verbunden. Die aktivierte NADPH-Oxidase produziert unter Verbrauch von NADPH im Zytosol an der Außenseite der Plasmamembran das Superoxidradikal  $O_2^{\cdot-}$ , welches zu  $H_2O_2$  dismutiert (Bedard & Krause, 2007). Das membrangängige  $H_2O_2$  diffundiert in die Zelle (Winterbourn & Hampton, 2008) und potenziert möglicherweise die Aktivität von MAK-2 (Maerz *et al.*, 2008). Aktiviertes MAK-2 inhibiert vermutlich die mitotische Kernteilung (Roca *et al.*, 2010) und könnte ähnlich wie in *S. cerevisiae* die transkriptionelle Induktion von Fusionsgenen bewirken. Darüber hinaus könnte es mit Hilfe des potentiellen Effektors BNI-1 an der Rekrutierung des Aktin-Zytoskeletts beteiligt sein (Bardwell, 2004, Lichius *et al.*, 2012, Matheos *et al.*, 2004, van Drogen *et al.*, 2001). Basierend auf den von Fleissner *et al.* präsentierten Daten inhibiert aktiviertes MAK-2 möglicherweise die Rekrutierung von SO (Fleissner *et al.*, 2009b). Wird ein gewisser Schwellenwert an Signalintensität erreicht, sorgen möglicherweise negative Rückkopplungs-Mechanismen dafür, dass die erregte MAP Kinase Kaskade resensibilisiert wird. Während die Rekrutierung von SO an die Plasmamembran nicht mehr inhibiert wird, geht die Zelle in den Sende-Modus über. Das Signalprotein BEM-1 wurde im Rahmen dieser Arbeit als ein schnell diffundierendes Protein charakterisiert, welches sich kortikal an der Spitze von wachsenden Keimlingen konzentriert. In dem hier präsentierten Modell stellt es ein mögliches Bindeglied dar, welches durch die Interaktion mit der Zellpolaritätsmaschinerie, dem MAP Kinase-Modul und ROS-generierenden Systemen drei wesentliche Funktionseinheiten miteinander koppelt. Durch die Modulierung von positiven und/oder negativen Rückkopplungen bietet es der interagierenden Zelle vermutlich die Möglichkeit zu einer integrativen räumlichen und zeitlichen Regulation von Signalkomponenten. Diese erlaubt es der Zelle auf effiziente Weise mit potentiellen Fusionspartnern zu kommunizieren und sich diesen mit vordringender Zellspitze durch fein abgestimmtes Ausrichten der Polaritätsachse zu nähern.

Weiterführende Forschungen anhand dieses Models haben erhebliches Potenzial unsere Kenntnisse über universelle und bisher noch nicht verstandene molekulare Schaltkreise in eukaryotischen Zellen zu erweitern. Die Identifizierung der molekularen Interaktionspartner von BEM-1 und darauf aufbauende detaillierte Untersuchungen zu den molekularen Zusammenhängen und Signalschaltkreisen sind diesbezüglich vielversprechende Herangehensweisen. Mit Hilfe von Kandidaten-Screenings basierend auf *Co-immunoprecipitation* (Co-IP) oder *Yeast-two-hybrid* (Y2H), bei denen BEM-1 als Köder eingesetzt würde, könnten möglicherweise entsprechende Interaktionspartner aus *whole cell*-Proteinextrakten bzw. einer entsprechenden Y2H-cDNA-Bank isoliert werden. Nach Möglichkeit sollten diesbezüglich Proteinextrakte bzw. RNA aus Zellen isoliert werden, welche sich kurz vor der Extraktion in gerichteten Interaktionen befanden. BEM-1 ist mit seinen drei Protein-Protein-Interaktionsdomänen für ein solches Screening ein aussichtsreicher Kandidat. Nach Identifizierung von möglichen Interaktionspartnern könnte die Überprüfung und detailliertere Untersuchung der molekularen Interaktionen *in vivo* mit Hilfe von *Bimolecular fluorescence complementation* (BiFC) in Angriff genommen werden. Abgesehen vom Wildtyp-Stamm könnten für diese Art von Experimenten unterschiedliche Mutanten in Betracht gezogen werden. Zur Untersuchung von Proteinen, welche eine oszillierende Membranrekrutierung während der Keimlingsinteraktionen zeigen, sind in erster Linie Kolokalisierungs-Studien mit MAK-2 und/oder SO aufschlussreich. Durch farblich unterschiedliche Proteinmarkierungen wird es möglich sein festzustellen, ob ein entsprechendes Protein parallel mit MAK-2 oder SO oszilliert. Die MAP Kinase Kinase STE-7 wäre beispielsweise ein Kandidat für eine solche Analyse (vgl. EG, Abschnitt 3.9). Für Proteine, welche am zellulären Kortex lokalisieren, wäre die Einordnung innerhalb einer Rangordnung von Interesse, welche die Austauschdynamik an der Plasmamembran repräsentiert. Proteine, welche anderen Proteinen am zellulären Kortex als Gerüst dienen, würden vermutlich einen verhältnismäßig trägen Wechsel zwischen einem Plasmamembran-gebundenen Zustand und einem durch zytosolische Diffusion gekennzeichneten Zustand zeigen. Die Erstellung einer solchen Rangordnung könnte dementsprechend dabei helfen, die betreffenden Gerüst-Proteine zu identifizieren. Zur Verwirklichung dessen dürfte FRAP (*Fluorescence recovery after photobleaching*) die Methode der Wahl sein. Diese und ähnliche Experimente sollten dabei helfen, die dynamischen Zusammenhänge der zeitlichen und räumlichen Regulation von

Zell-Zell-Kommunikations-Modulen während der vegetativen Zell-Fusion in *N. crassa* auf die nächst höhere Ebene der Erkenntnis zu befördern.

- Adams, A. E., D. I. Johnson, R. M. Longnecker, B. F. Sloat & J. R. Pringle, (1990) CDC42 and CDC43, two additional genes involved in budding and the establishment of cell polarity in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* 111: 131-142.
- Adamson, J. W. & C. A. Finch, (1975) Hemoglobin function, oxygen affinity, and erythropoietin. *Annu Rev Physiol* 37: 351-369.
- Aguirre, J. & J. D. Lambeth, (2010) Nox enzymes from fungus to fly to fish and what they tell us about Nox function in mammals. *Free Radic Biol Med* 49: 1342-1353.
- Aguirre, J., M. Rios-Momberg, D. Hewitt & W. Hansberg, (2005) Reactive oxygen species and development in microbial eukaryotes. *Trends Microbiol* 13: 111-118.
- Aldabbous, M. S., M. G. Roca, A. Stout, I. C. Huang, N. D. Read & S. J. Free, (2010) The ham-5, rcm-1 and rco-1 genes regulate hyphal fusion in *Neurospora crassa*. *Microbiology* 156: 2621-2629.
- Altschul, S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers & D. J. Lipman, (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215: 403-410.
- Alvarez-Tabares, I. & J. Perez-Martin, (2008) Cdk5 kinase regulates the association between adaptor protein Bem1 and GEF Cdc24 in the fungus *Ustilago maydis*. *J Cell Sci* 121: 2824-2832.
- Araujo-Palomares, C. L., E. Castro-Longoria & M. Riquelme, (2007) Ontogeny of the Spitzenkorper in germlings of *Neurospora crassa*. *Fungal Genet Biol* 44: 492-503.
- Araujo-Palomares, C. L., C. Richthammer, S. Seiler & E. Castro-Longoria, (2011) Functional Characterization and Cellular Dynamics of the CDC-42 - RAC - CDC-24 Module in *Neurospora crassa*. *PLoS One* 6: e27148.
- Araujo-Palomares, C. L., M. Riquelme & E. Castro-Longoria, (2009) The polarisome component SPA-2 localizes at the apex of *Neurospora crassa* and partially colocalizes with the Spitzenkorper. *Fungal Genet Biol* 46: 551-563.
- Ash, J., C. Wu, R. Larocque, M. Jamal, W. Stevens, M. Osborne, D. Y. Thomas & M. Whiteway, (2003) Genetic analysis of the interface between Cdc42p and the CRIB domain of Ste20p in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 163: 9-20.
- Atkins, B. D., S. Yoshida & D. Pellman, (2008) Symmetry breaking: scaffold plays matchmaker for polarity signaling proteins. *Curr Biol* 18: R1130-1132.
- Avinoam, O. & B. Podbilewicz, (2011) Eukaryotic cell-cell fusion families. *Curr Top Membr* 68: 209-234.
- Babior, B. M., R. S. Kipnes & J. T. Curnutte, (1973) Biological defense mechanisms. The production by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent. *J Clin Invest* 52: 741-744.
- Bardwell, L., (2004) A walk-through of the yeast mating pheromone response pathway. *Peptides* 25: 1465-1476.
- Bardwell, L., J. G. Cook, E. C. Chang, B. R. Cairns & J. Thorner, (1996) Signaling in the yeast pheromone response pathway: specific and high-affinity interaction of the mitogen-activated protein (MAP) kinases Kss1 and Fus3 with the upstream MAP kinase kinase Ste7. *Mol Cell Biol* 16: 3637-3650.
- Bedard, K. & K. H. Krause, (2007) The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev* 87: 245-313.
- Bellingham, A. J., (1976) Haemoglobins with altered oxygen affinity. *Br Med Bull* 32: 234-238.

- Beltrán-Aguilar, A., E. Bredeweg, S. Bartnicki-García, M. Freitag & M. Riquelme, (2009) The exocyst in *Neurospora crassa*: a tale of vesicles, fusions and apical growth (Poster). In: 25th Fungal Genetics Conference. Asilomar, CA.
- Bender, A. & J. R. Pringle, (1989) Multicopy suppression of the *cdc24* budding defect in yeast by *CDC42* and three newly identified genes including the ras-related gene *RSR1*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86: 9976-9980.
- Bender, A. & J. R. Pringle, (1991) Use of a screen for synthetic lethal and multicopy suppressor mutants to identify two new genes involved in morphogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 11: 1295-1305.
- Benoist, M., S. Gaillard & F. Castets, (2006) The striatin family: a new signaling platform in dendritic spines. *J Physiol Paris* 99: 146-153.
- Berkovich, R., H. Wolfenson, S. Eisenberg, M. Ehrlich, M. Weiss, J. Klafter, Y. I. Henis & M. Urbakh, (2011) Accurate quantification of diffusion and binding kinetics of non-integral membrane proteins by FRAP. *Traffic* 12: 1648-1657.
- Bobrowicz, P., R. Pawlak, A. Correa, D. Bell-Pedersen & D. J. Ebbole, (2002) The *Neurospora crassa* pheromone precursor genes are regulated by the mating type locus and the circadian clock. *Mol Microbiol* 45: 795-804.
- Borkovich, K. A., L. A. Alex, O. Yarden, M. Freitag, G. E. Turner, N. D. Read, S. Seiler, D. Bell-Pedersen, J. Paietta, N. Plesofsky, M. Plamann, M. Goodrich-Tanrikulu, U. Schulte, G. Mannhaupt, F. E. Nargang, A. Radford, C. Selitrennikoff, J. E. Galagan, J. C. Dunlap, J. J. Loros, D. Catcheside, H. Inoue, R. Aramayo, M. Polymenis, E. U. Selker, M. S. Sachs, G. A. Marzluf, I. Paulsen, R. Davis, D. J. Ebbole, A. Zelter, E. R. Kalkman, R. O'Rourke, F. Bowring, J. Yeadon, C. Ishii, K. Suzuki, W. Sakai & R. Pratt, (2004) Lessons from the genome sequence of *Neurospora crassa*: tracing the path from genomic blueprint to multicellular organism. *Microbiol Mol Biol Rev* 68: 1-108.
- Bose, I., J. E. Irazoqui, J. J. Moskow, E. S. Bardes, T. R. Zyla & D. J. Lew, (2001) Assembly of scaffold-mediated complexes containing Cdc42p, the exchange factor Cdc24p, and the effector Cla4p required for cell cycle-regulated phosphorylation of Cdc24p. *J Biol Chem* 276: 7176-7186.
- Brandman, O., J. E. Ferrell, Jr., R. Li & T. Meyer, (2005) Interlinked fast and slow positive feedback loops drive reliable cell decisions. *Science* 310: 496-498.
- Brockman, H. E. & F. J. De Serres, (1963) "Sorbose toxicity" in *Neurospora*. *Am. J. Bot.* 50: 709-714.
- Butty, A. C., N. Perrinjaquet, A. Petit, M. Jaquenoud, J. E. Segall, K. Hofmann, C. Zwahlen & M. Peter, (2002) A positive feedback loop stabilizes the guanine-nucleotide exchange factor Cdc24 at sites of polarization. *EMBO J* 21: 1565-1576.
- Butty, A. C., P. M. Pryciak, L. S. Huang, I. Herskowitz & M. Peter, (1998) The role of Far1p in linking the heterotrimeric G protein to polarity establishment proteins during yeast mating. *Science* 282: 1511-1516.
- Cano-Dominguez, N., K. Alvarez-Delfin, W. Hansberg & J. Aguirre, (2008) NADPH oxidases NOX-1 and NOX-2 require the regulatory subunit NOR-1 to control cell differentiation and growth in *Neurospora crassa*. *Eukaryot Cell* 7: 1352-1361.
- Cardenas, L., A. Martinez, F. Sanchez & C. Quinto, (2008) Fast, transient and specific intracellular ROS changes in living root hair cells responding to Nod factors (NFs). *Plant J* 56: 802-813.
- Carr, C. M. & J. Rizo, (2010) At the junction of SNARE and SM protein function. *Curr Opin Cell Biol* 22: 488-495.

- Casamayor, A. & M. Snyder, (2002) Bud-site selection and cell polarity in budding yeast. *Curr Opin Microbiol* 5: 179-186.
- Chant, J., (1994) Cell polarity in yeast. *Trends Genet* 10: 328-333.
- Chant, J., K. Corrado, J. R. Pringle & I. Herskowitz, (1991) Yeast BUD5, encoding a putative GDP-GTP exchange factor, is necessary for bud site selection and interacts with bud formation gene BEM1. *Cell* 65: 1213-1224.
- Chant, J. & I. Herskowitz, (1991) Genetic control of bud site selection in yeast by a set of gene products that constitute a morphogenetic pathway. *Cell* 65: 1203-1212.
- Chant, J. & L. Stowers, (1995) GTPase cascades choreographing cellular behavior: movement, morphogenesis, and more. *Cell* 81: 1-4.
- Chen, E. H., E. Grote, W. Mohler & A. Vignery, (2007) Cell-cell fusion. *FEBS Lett* 581: 2181-2193.
- Chen, E. H. & E. N. Olson, (2005) Unveiling the mechanisms of cell-cell fusion. *Science* 308: 369-373.
- Chenevert, J., (1994) Cell polarization directed by extracellular cues in yeast. *Mol Biol Cell* 5: 1169-1175.
- Chenevert, J., K. Corrado, A. Bender, J. Pringle & I. Herskowitz, (1992) A yeast gene (BEM1) necessary for cell polarization whose product contains two SH3 domains. *Nature* 356: 77-79.
- Chenevert, J., N. Valtz & I. Herskowitz, (1994) Identification of genes required for normal pheromone-induced cell polarization in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 136: 1287-1296.
- Colot, H. V., G. Park, G. E. Turner, C. Ringelberg, C. M. Crew, L. Litvinkova, R. L. Weiss, K. A. Borkovich & J. C. Dunlap, (2006) A high-throughput gene knockout procedure for *Neurospora* reveals functions for multiple transcription factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 10352-10357.
- Cvrckova, F., C. De Virgilio, E. Manser, J. R. Pringle & K. Nasmyth, (1995) Ste20-like protein kinases are required for normal localization of cell growth and for cytokinesis in budding yeast. *Genes Dev* 9: 1817-1830.
- Diebold, B. A. & G. M. Bokoch, (2001) Molecular basis for Rac2 regulation of phagocyte NADPH oxidase. *Nat Immunol* 2: 211-215.
- Diebold, B. A., B. Fowler, J. Lu, M. C. Dinauer & G. M. Bokoch, (2004) Antagonistic cross-talk between Rac and Cdc42 GTPases regulates generation of reactive oxygen species. *J Biol Chem* 279: 28136-28142.
- Dinauer, M. C., E. A. Pierce, G. A. Bruns, J. T. Curnutte & S. H. Orkin, (1990) Human neutrophil cytochrome b light chain (p22-phox). Gene structure, chromosomal location, and mutations in cytochrome-negative autosomal recessive chronic granulomatous disease. *J Clin Invest* 86: 1729-1737.
- Dohlman, H. G., (2002) G proteins and pheromone signaling. *Annu Rev Physiol* 64: 129-152.
- Drees, B. L., B. Sundin, E. Brazeau, J. P. Caviston, G. C. Chen, W. Guo, K. G. Kozminski, M. W. Lau, J. J. Moskow, A. Tong, L. R. Schenkman, A. McKenzie, 3rd, P. Brennwald, M. Longtine, E. Bi, C. Chan, P. Novick, C. Boone, J. R. Pringle, T. N. Davis, S. Fields & D. G. Drubin, (2001) A protein interaction map for cell polarity development. *J Cell Biol* 154: 549-571.
- Drogen, F., S. M. O'Rourke, V. M. Stucke, M. Jaquenoud, A. M. Neiman & M. Peter, (2000) Phosphorylation of the MEKK Ste11p by the PAK-like kinase Ste20p is required for MAP kinase signaling in vivo. *Curr Biol* 10: 630-639.

- Earp, L. J., S. E. Delos, H. E. Park & J. M. White, (2005) The many mechanisms of viral membrane fusion proteins. *Curr Top Microbiol Immunol* 285: 25-66.
- Elion, E. A., P. L. Grisafi & G. R. Fink, (1990) FUS3 encodes a cdc2+/CDC28-related kinase required for the transition from mitosis into conjugation. *Cell* 60: 649-664.
- Ellson, C. D., S. Andrews, L. R. Stephens & P. T. Hawkins, (2002) The PX domain: a new phosphoinositide-binding module. *J Cell Sci* 115: 1099-1105.
- Endo, M., M. Shirouzu & S. Yokoyama, (2003) The Cdc42 binding and scaffolding activities of the fission yeast adaptor protein Scd2. *J Biol Chem* 278: 843-852.
- Etienne-Manneville, S., (2004) Cdc42--the centre of polarity. *J Cell Sci* 117: 1291-1300.
- Evangelista, M., K. Blundell, M. S. Longtine, C. J. Chow, N. Adames, J. R. Pringle, M. Peter & C. Boone, (1997) Bni1p, a yeast formin linking cdc42p and the actin cytoskeleton during polarized morphogenesis. *Science* 276: 118-122.
- Fairn, G. D., M. Hermansson, P. Somerharju & S. Grinstein, (2011) Phosphatidylserine is polarized and required for proper Cdc42 localization and for development of cell polarity. *Nat Cell Biol* 13: 1424-1430.
- Finkel, T., (2001) Reactive oxygen species and signal transduction. *IUBMB Life* 52: 3-6.
- Fleissner, A., (2012) Hyphal Fusion. In: Morphogenesis and Pathogenicity in Fungi. J. Pérez-Martín & A. Di Pietro (eds). Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Fleissner, A., S. Diamond & N. L. Glass, (2009a) The *Saccharomyces cerevisiae* PRM1 homolog in *Neurospora crassa* is involved in vegetative and sexual cell fusion events but also has postfertilization functions. *Genetics* 181: 497-510.
- Fleissner, A. & N. L. Glass, (2007) SO, a protein involved in hyphal fusion in *Neurospora crassa*, localizes to septal plugs. *Eukaryot Cell* 6: 84-94.
- Fleissner, A., A. C. Leeder, M. G. Roca, N. D. Read & N. L. Glass, (2009b) Oscillatory recruitment of signaling proteins to cell tips promotes coordinated behavior during cell fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 19387-19392.
- Fleissner, A., S. Sarkar, D. J. Jacobson, M. G. Roca, N. D. Read & N. L. Glass, (2005) The so locus is required for vegetative cell fusion and postfertilization events in *Neurospora crassa*. *Eukaryot Cell* 4: 920-930.
- Fleissner, A., A. R. Simonin & N. L. Glass, (2008) Cell fusion in the filamentous fungus, *Neurospora crassa*. *Methods Mol Biol* 475: 21-38.
- Fortwendel, J. R., K. K. Fuller, T. J. Stephens, W. C. Bacon, D. S. Askew & J. C. Rhodes, (2008) *Aspergillus fumigatus* RasA regulates asexual development and cell wall integrity. *Eukaryot Cell* 7: 1530-1539.
- France, Y. E., C. Boyd, J. Coleman & P. J. Novick, (2006) The polarity-establishment component Bem1p interacts with the exocyst complex through the Sec15p subunit. *J Cell Sci* 119: 876-888.
- Freisinger, T. & R. Wedlich-Soldner, (2011) Phosphatidylserine promotes polar Cdc42 localization. *Nat Cell Biol* 13: 1387-1388.
- Freitag, M., P. C. Hickey, N. B. Raju, E. U. Selker & N. D. Read, (2004) GFP as a tool to analyze the organization, dynamics and function of nuclei and microtubules in *Neurospora crassa*. *Fungal Genet Biol* 41: 897-910.
- Frieser, S. H., A. Hlubek, B. Sandrock & M. Bolker, (2011) Cla4 kinase triggers destruction of the Rac1-GEF Cdc24 during polarized growth in *Ustilago maydis*. *Mol Biol Cell* 22: 3253-3262.



- Fu, C., P. Iyer, A. Herkal, J. Abdullah, A. Stout & S. J. Free, (2011) Identification and characterization of genes required for cell-to-cell fusion in *Neurospora crassa*. *Eukaryot Cell* 10: 1100-1109.
- Gartner, A., A. Jovanovic, D. I. Jeoung, S. Bourlat, F. R. Cross & G. Ammerer, (1998) Pheromone-dependent G1 cell cycle arrest requires Far1 phosphorylation, but may not involve inhibition of Cdc28-Cln2 kinase, in vivo. *Mol Cell Biol* 18: 3681-3691.
- Gartner, A., K. Nasmyth & G. Ammerer, (1992) Signal transduction in *Saccharomyces cerevisiae* requires tyrosine and threonine phosphorylation of FUS3 and KSS1. *Genes Dev* 6: 1280-1292.
- Girbardt, M., (1957) Der Spitzenkörper von *Polystictus versicolor*. *Planta*: 47-59.
- Glass, N. L., D. J. Jacobson & P. K. Shiu, (2000) The genetics of hyphal fusion and vegetative incompatibility in filamentous ascomycete fungi. *Annu Rev Genet* 34: 165-186.
- Goryachev, A. B. & A. V. Pokhilko, (2008) Dynamics of Cdc42 network embodies a Turing-type mechanism of yeast cell polarity. *FEBS Lett* 582: 1437-1443.
- Gulli, M. P., M. Jaquenoud, Y. Shimada, G. Niederhauser, P. Wiget & M. Peter, (2000) Phosphorylation of the Cdc42 exchange factor Cdc24 by the PAK-like kinase Cla4 may regulate polarized growth in yeast. *Mol Cell* 6: 1155-1167.
- Guzzo, R. M., J. Wigle, M. Salih, E. D. Moore & B. S. Tuana, (2004) Regulated expression and temporal induction of the tail-anchored sarcolemmal-membrane-associated protein is critical for myoblast fusion. *Biochem J* 381: 599-608.
- Haber, J. E., (1998) Mating-type gene switching in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu Rev Genet* 32: 561-599.
- Han, B. K., L. M. Bogomolnaya, J. M. Totten, H. M. Blank, L. J. Dangott & M. Polymenis, (2005) Bem1p, a scaffold signaling protein, mediates cyclin-dependent control of vacuolar homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev* 19: 2606-2618.
- Harris, S. D., (2006) Cell polarity in filamentous fungi: shaping the mold. *Int Rev Cytol* 251: 41-77.
- Harris, S. D., (2008) Branching of fungal hyphae: regulation, mechanisms and comparison with other branching systems. *Mycologia* 100: 823-832.
- Harris, S. D., (2011) Cdc42/Rho GTPases in fungi: variations on a common theme. *Mol Microbiol* 79: 1123-1127.
- Harris, S. D. & M. Momany, (2004) Polarity in filamentous fungi: moving beyond the yeast paradigm. *Fungal Genet Biol* 41: 391-400.
- Hayakawa, Y., E. Ishikawa, J. Y. Shoji, H. Nakano & K. Kitamoto, (2011) Septum-directed secretion in the filamentous fungus *Aspergillus oryzae*. *Mol Microbiol* 81: 40-55.
- Hlubek, A., K. O. Schink, M. Mahlert, B. Sandrock & M. Bolker, (2008) Selective activation by the guanine nucleotide exchange factor Don1 is a main determinant of Cdc42 signalling specificity in *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol* 68: 615-623.
- Houk, A. R., A. Millius & O. D. Weiner, (2009) Compete globally, bud locally. *Cell* 139: 656-658.
- Howell, A. S., N. S. Savage, S. A. Johnson, I. Bose, A. W. Wagner, T. R. Zyla, H. F. Nijhout, M. C. Reed, A. B. Goryachev & D. J. Lew, (2009) Singularity in polarization: rewiring yeast cells to make two buds. *Cell* 139: 731-743.
- Hutter, H. & R. Schnabel, (1994) glp-1 and inductions establishing embryonic axes in *C. elegans*. *Development* 120: 2051-2064.

- Irazoqui, J. E., A. S. Gladfelter & D. J. Lew, (2003) Scaffold-mediated symmetry breaking by Cdc42p. *Nat Cell Biol* 5: 1062-1070.
- Ishii, M. & Y. Saeki, (2008) Osteoclast cell fusion: mechanisms and molecules. *Mod Rheumatol* 18: 220-227.
- Ito, T., Y. Matsui, T. Ago, K. Ota & H. Sumimoto, (2001) Novel modular domain PB1 recognizes PC motif to mediate functional protein-protein interactions. *EMBO J* 20: 3938-3946.
- Jakubowski, W. & G. Bartosz, (2000) 2,7-dichlorofluorescein oxidation and reactive oxygen species: what does it measure? *Cell Biol Int* 24: 757-760.
- Jamet-Vierny, C., R. Debuchy, M. Prigent & P. Silar, (2007) IDC1, a pezizomycotina-specific gene that belongs to the PaMpk1 MAP kinase transduction cascade of the filamentous fungus *Podospira anserina*. *Fungal Genet Biol* 44: 1219-1230.
- Johnson, D. I., (1999) Cdc42: An essential Rho-type GTPase controlling eukaryotic cell polarity. *Microbiol Mol Biol Rev* 63: 54-105.
- Jones, L. A. & P. E. Sudbery, (2010) Spitzenkorper, exocyst and polarisome components in *Candida albicans* hyphae show different patterns of localization and have distinct dynamic properties. *Eukaryot Cell*.
- Kaneko, T., L. Li & S. S. Li, (2008) The SH3 domain - a family of versatile peptide- and protein-recognition module. *Front Biosci* 13: 4938-4952.
- Kao, L. R., J. Peterson, R. Ji, L. Bender & A. Bender, (1996) Interactions between the ankyrin repeat-containing protein Akr1p and the pheromone response pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 16: 168-178.
- Kawahara, T. & J. D. Lambeth, (2007) Molecular evolution of Phox-related regulatory subunits for NADPH oxidase enzymes. *BMC Evol Biol* 7: 178.
- Kays, A. M. & K. A. Borkovich, (2004) Severe impairment of growth and differentiation in a *Neurospora crassa* mutant lacking all heterotrimeric G alpha proteins. *Genetics* 166: 1229-1240.
- Kim, H. & K. A. Borkovich, (2004) A pheromone receptor gene, pre-1, is essential for mating type-specific directional growth and fusion of trichogynes and female fertility in *Neurospora crassa*. *Mol Microbiol* 52: 1781-1798.
- Kim, H. & K. A. Borkovich, (2006) Pheromones are essential for male fertility and sufficient to direct chemotropic polarized growth of trichogynes during mating in *Neurospora crassa*. *Eukaryot Cell* 5: 544-554.
- Knop, M., (2011) Yeast cell morphology and sexual reproduction--a short overview and some considerations. *C R Biol* 334: 599-606.
- Kozubowski, L., K. Saito, J. M. Johnson, A. S. Howell, T. R. Zyla & D. J. Lew, (2008) Symmetry-breaking polarization driven by a Cdc42p GEF-PAK complex. *Curr Biol* 18: 1719-1726.
- Lalucque, H. & P. Silar, (2003) NADPH oxidase: an enzyme for multicellularity? *Trends Microbiol* 11: 9-12.
- Lara-Ortiz, T., H. Riveros-Rosas & J. Aguirre, (2003) Reactive oxygen species generated by microbial NADPH oxidase NoxA regulate sexual development in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* 50: 1241-1255.
- Leberer, E., D. Dignard, D. Y. Thomas & T. Leeuw, (2000) A conserved Gbeta binding (GBB) sequence motif in Ste20p/PAK family protein kinases. *Biol Chem* 381: 427-431.
- Lee, S. R., K. S. Kwon, S. R. Kim & S. G. Rhee, (1998) Reversible inactivation of protein-tyrosine phosphatase 1B in A431 cells stimulated with epidermal growth factor. *J Biol Chem* 273: 15366-15372.

- Leeder, A. C. & G. Turner, (2008) Characterisation of *Aspergillus nidulans* polarisome component BemA. *Fungal Genet Biol* 45: 897-911.
- Leeuw, T., A. Fourest-Lieuvin, C. Wu, J. Chenevert, K. Clark, M. Whiteway, D. Y. Thomas & E. Leberer, (1995) Pheromone response in yeast: association of Bem1p with proteins of the MAP kinase cascade and actin. *Science* 270: 1210-1213.
- Levin, D. E., (2005) Cell wall integrity signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* 69: 262-291.
- Lew, D. J. & S. I. Reed, (1995) Cell cycle control of morphogenesis in budding yeast. *Curr Opin Genet Dev* 5: 17-23.
- Li, J., M. Stouffs, L. Serrander, B. Banfi, E. Bettiol, Y. Charnay, K. Steger, K. H. Krause & M. E. Jaconi, (2006) The NADPH oxidase NOX4 drives cardiac differentiation: Role in regulating cardiac transcription factors and MAP kinase activation. *Mol Biol Cell* 17: 3978-3988.
- Lichius, A., M. E. Yanez-Gutierrez, N. D. Read & E. Castro-Longoria, (2012) Comparative Live-Cell Imaging Analyses of SPA-2, BUD-6 and BNI-1 in *Neurospora crassa* Reveal Novel Features of the Filamentous Fungal Polarisome. *PLoS One* 7: e30372.
- Lipschutz, J. H. & K. E. Mostov, (2002) Exocytosis: the many masters of the exocyst. *Curr Biol* 12: R212-214.
- Lyons, D. M., S. K. Mahanty, K. Y. Choi, M. Manandhar & E. A. Elion, (1996) The SH3-domain protein Bem1 coordinates mitogen-activated protein kinase cascade activation with cell cycle control in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 16: 4095-4106.
- Maerz, S., C. Ziv, N. Vogt, K. Helmstaedt, N. Cohen, R. Gorovits, O. Yarden & S. Seiler, (2008) The nuclear Dbf2-related kinase COT1 and the mitogen-activated protein kinases MAK1 and MAK2 genetically interact to regulate filamentous growth, hyphal fusion and sexual development in *Neurospora crassa*. *Genetics* 179: 1313-1325.
- Malagnac, F., H. Lalucque, G. Lepere & P. Silar, (2004) Two NADPH oxidase isoforms are required for sexual reproduction and ascospore germination in the filamentous fungus *Podospora anserina*. *Fungal Genet Biol* 41: 982-997.
- Marco, E., R. Wedlich-Soldner, R. Li, S. J. Altschuler & L. F. Wu, (2007) Endocytosis optimizes the dynamic localization of membrane proteins that regulate cortical polarity. *Cell* 129: 411-422.
- Margolin, B. S., M. Freitag and E. U. Selker, (1997) Improved plasmids for gene targeting at the *his-3* locus of *Neurospora crassa* by electroporation. *Fungal Genet. Newslett.* 44: 34-36.
- Matheos, D., M. Metodiev, E. Muller, D. Stone & M. D. Rose, (2004) Pheromone-induced polarization is dependent on the Fus3p MAPK acting through the formin Bni1p. *J Cell Biol* 165: 99-109.
- Momany, M., (2002) Polarity in filamentous fungi: establishment, maintenance and new axes. *Curr Opin Microbiol* 5: 580-585.
- Moskow, J. J., A. S. Gladfelter, R. E. Lamson, P. M. Pryciak & D. J. Lew, (2000) Role of Cdc42p in pheromone-stimulated signal transduction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 20: 7559-7571.
- Nasmyth, K. A., (1982) Molecular genetics of yeast mating type. *Annu Rev Genet* 16: 439-500.
- Neiman, A. M. & I. Herskowitz, (1994) Reconstitution of a yeast protein kinase cascade in vitro: activation of the yeast MEK homologue STE7 by STE11. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 3398-3402.

- Nern, A. & R. A. Arkowitz, (1999) A Cdc24p-Far1p-Gbetagamma protein complex required for yeast orientation during mating. *J Cell Biol* 144: 1187-1202.
- Niethammer, P., C. Grabher, A. T. Look & T. J. Mitchison, (2009) A tissue-scale gradient of hydrogen peroxide mediates rapid wound detection in zebrafish. *Nature* 459: 996-999.
- Ninomiya, Y., K. Suzuki, C. Ishii & H. Inoue, (2004) Highly efficient gene replacements in *Neurospora* strains deficient for nonhomologous end-joining. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 12248-12253.
- Nisimoto, Y., S. Motalebi, C. H. Han & J. D. Lambeth, (1999) The p67(phox) activation domain regulates electron flow from NADPH to flavin in flavocytochrome b 558. *J Biol Chem* 274: 22999-23005.
- Ozaki-Kuroda, K., Y. Yamamoto, H. Nohara, M. Kinoshita, T. Fujiwara, K. Irie & Y. Takai, (2001) Dynamic localization and function of Bni1p at the sites of directed growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 21: 827-839.
- Pandey, A., M. G. Roca, N. D. Read & N. L. Glass, (2004) Role of a mitogen-activated protein kinase pathway during conidial germination and hyphal fusion in *Neurospora crassa*. *Eukaryot Cell* 3: 348-358.
- Park, H. O. & E. Bi, (2007) Central roles of small GTPases in the development of cell polarity in yeast and beyond. *Microbiol Mol Biol Rev* 71: 48-96.
- Park, H. O., E. Bi, J. R. Pringle & I. Herskowitz, (1997) Two active states of the Ras-related Bud1/Rsr1 protein bind to different effectors to determine yeast cell polarity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 4463-4468.
- Park, H. O., P. J. Kang & A. W. Rachfal, (2002) Localization of the Rsr1/Bud1 GTPase involved in selection of a proper growth site in yeast. *J Biol Chem* 277: 26721-26724.
- Peter, M. & I. Herskowitz, (1994) Direct inhibition of the yeast cyclin-dependent kinase Cdc28-Cln by Far1. *Science* 265: 1228-1231.
- Podbilewicz, B., (2006) Cell fusion. *WormBook*: 1-32.
- Pruyne, D. & A. Bretscher, (2000) Polarization of cell growth in yeast. I. Establishment and maintenance of polarity states. *J Cell Sci* 113 ( Pt 3): 365-375.
- Pryciak, P. M. & F. A. Huntress, (1998) Membrane recruitment of the kinase cascade scaffold protein Ste5 by the Gbetagamma complex underlies activation of the yeast pheromone response pathway. *Genes Dev* 12: 2684-2697.
- Raju, N. B., (2009) *Neurospora* as a model fungus for studies in cytogenetics and sexual biology at Stanford. *J Biosci* 34: 139-159.
- Read, N. D., (2011) Exocytosis and growth do not occur only at hyphal tips. *Mol Microbiol* 81: 4-7.
- Read, N. D., A. Lichius, J. Y. Shoji & A. B. Goryachev, (2009) Self-signalling and self-fusion in filamentous fungi. *Curr Opin Microbiol* 12: 608-615.
- Richard, F., N. L. Glass & A. Pringle, (2012) Cooperation among germinating spores facilitates the growth of the fungus, *Neurospora crassa*. *Biol Lett*.
- Riquelme, M., C. G. Reynaga-Pena, G. Gierz & S. Bartnicki-Garcia, (1998) What determines growth direction in fungal hyphae? *Fungal Genet Biol* 24: 101-109.
- Riquelme, M., O. Yarden, S. Bartnicki-Garcia, B. Bowman, E. Castro-Longoria, S. J. Free, A. Fleissner, M. Freitag, R. R. Lew, R. Mourino-Perez, M. Plamann, C. Rasmussen, C. Richthammer, R. W. Roberson, E. Sanchez-Leon, S. Seiler & M. K. Watters, (2011) Architecture and development of the *Neurospora crassa* hypha - a model cell for polarized growth. *Fungal Biol* 115: 446-474.
- Roberts, C. J., B. Nelson, M. J. Marton, R. Stoughton, M. R. Meyer, H. A. Bennett, Y. D. He, H. Dai, W. L. Walker, T. R. Hughes, M. Tyers, C. Boone & S. H. Friend, (2000)

- Signaling and circuitry of multiple MAPK pathways revealed by a matrix of global gene expression profiles. *Science* 287: 873-880.
- Roca, M. G., J. Arlt, C. E. Jeffree & N. D. Read, (2005) Cell biology of conidial anastomosis tubes in *Neurospora crassa*. *Eukaryot Cell* 4: 911-919.
- Roca, M. G., L. C. Davide, M. C. Mendes-Costa & A. Wheals, (2003) Conidial anastomosis tubes in *Colletotrichum*. *Fungal Genet Biol* 40: 138-145.
- Roca, M. G., H. C. Kuo, A. Lichius, M. Freitag & N. D. Read, (2010) Nuclear dynamics, mitosis, and the cytoskeleton during the early stages of colony initiation in *Neurospora crassa*. *Eukaryot Cell* 9: 1171-1183.
- Roca, M. G., M. Weichert, U. Siegmund, P. Tudzynski & A. Fleißner, (2012) Germling fusion *via* conidial anastomosis tubes in the grey mould *Botrytis cinerea* requires NADPH oxidase activity. *Fungal Biology*. In press.
- Rolke, Y. & P. Tudzynski, (2008) The small GTPase Rac and the p21-activated kinase Cla4 in *Claviceps purpurea*: interaction and impact on polarity, development and pathogenicity. *Mol Microbiol* 68: 405-423.
- Royer-Pokora, B., L. M. Kunkel, A. P. Monaco, S. C. Goff, P. E. Newburger, R. L. Baehner, F. S. Cole, J. T. Curnutte & S. H. Orkin, (1986) Cloning the gene for an inherited human disorder--chronic granulomatous disease--on the basis of its chromosomal location. *Nature* 322: 32-38.
- Sagot, I., A. A. Rodal, J. Moseley, B. L. Goode & D. Pellman, (2002) An actin nucleation mechanism mediated by Bni1 and profilin. *Nat Cell Biol* 4: 626-631.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch & T. Maniatis, (1989) *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York.
- Sanchez-Leon, E., J. Verdin, M. Freitag, R. W. Roberson, S. Bartnicki-Garcia & M. Riquelme, (2011) Traffic of chitin synthase 1 (CHS-1) to the Spitzenkorper and developing septa in hyphae of *Neurospora crassa*: actin dependence and evidence of distinct microvesicle populations. *Eukaryot Cell* 10: 683-695.
- Schnabel, R., H. Hutter, D. Moerman & H. Schnabel, (1997) Assessing normal embryogenesis in *Caenorhabditis elegans* using a 4D microscope: variability of development and regional specification. *Dev Biol* 184: 234-265.
- Schrick, K., B. Garvik & L. H. Hartwell, (1997) Mating in *Saccharomyces cerevisiae*: the role of the pheromone signal transduction pathway in the chemotropic response to pheromone. *Genetics* 147: 19-32.
- Scott, B. & C. J. Eaton, (2008) Role of reactive oxygen species in fungal cellular differentiations. *Curr Opin Microbiol* 11: 488-493.
- Seale, T., (1973) Life cycle of *Neurospora crassa* viewed by scanning electron microscopy. *J Bacteriol* 113: 1015-1025.
- Semighini, C. P. & S. D. Harris, (2008) Regulation of apical dominance in *Aspergillus nidulans* hyphae by reactive oxygen species. *Genetics* 179: 1919-1932.
- Sharpless, K. E. & S. D. Harris, (2002) Functional characterization and localization of the *Aspergillus nidulans* formin SEPA. *Mol Biol Cell* 13: 469-479.
- Shemer, G. & B. Podbilewicz, (2003) The story of cell fusion: big lessons from little worms. *Bioessays* 25: 672-682.
- Sheu, Y. J., B. Santos, N. Fortin, C. Costigan & M. Snyder, (1998) Spa2p interacts with cell polarity proteins and signaling components involved in yeast cell morphogenesis. *Mol Cell Biol* 18: 4053-4069.
- Shimada, Y., M. P. Gulli & M. Peter, (2000) Nuclear sequestration of the exchange factor Cdc24 by Far1 regulates cell polarity during yeast mating. *Nat Cell Biol* 2: 117-124.

- Shimada, Y., P. Wiget, M. P. Gulli, E. Bi & M. Peter, (2004) The nucleotide exchange factor Cdc24p may be regulated by auto-inhibition. *EMBO J* 23: 1051-1062.
- Simonin, A. R., C. G. Rasmussen, M. Yang & N. L. Glass, (2010) Genes encoding a striatin-like protein (ham-3) and a forkhead associated protein (ham-4) are required for hyphal fusion in *Neurospora crassa*. *Fungal Genet Biol* 47: 855-868.
- Slaughter, B. D., S. E. Smith & R. Li, (2009) Symmetry breaking in the life cycle of the budding yeast. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 1: a003384.
- Sohrmann, M. & M. Peter, (2003) Polarizing without a cue. *Trends Cell Biol* 13: 526-533.
- Springer, M. L., (1993) Genetic control of fungal differentiation: the three sporulation pathways of *Neurospora crassa*. *Bioessays* 15: 365-374.
- Springer, M. L. & C. Yanofsky, (1989) A morphological and genetic analysis of conidiophore development in *Neurospora crassa*. *Genes Dev* 3: 559-571.
- Stahelin, R. V., D. Karathanassis, D. Murray, R. L. Williams & W. Cho, (2007) Structural and membrane binding analysis of the Phox homology domain of Bem1p: basis of phosphatidylinositol 4-phosphate specificity. *J Biol Chem* 282: 25737-25747.
- Steinberg, G., (2007) Hyphal growth: a tale of motors, lipids, and the Spitzenkorper. *Eukaryot Cell* 6: 351-360.
- Sudbery, P., (2011) Fluorescent proteins illuminate the structure and function of the hyphal tip apparatus. *Fungal Genet Biol* 48: 849-857.
- Sumimoto, H., S. Kamakura & T. Ito, (2007) Structure and function of the PB1 domain, a protein interaction module conserved in animals, fungi, amoebas, and plants. *Sci STKE* 2007: re6.
- Takemoto, D., S. Kamakura, S. Saikia, Y. Becker, R. Wrenn, A. Tanaka, H. Sumimoto & B. Scott, (2011) Polarity proteins Bem1 and Cdc24 are components of the filamentous fungal NADPH oxidase complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*.
- Takemoto, D., A. Tanaka & B. Scott, (2006) A p67Phox-like regulator is recruited to control hyphal branching in a fungal-grass mutualistic symbiosis. *Plant Cell* 18: 2807-2821.
- Teahan, C., P. Rowe, P. Parker, N. Totty & A. W. Segal, (1987) The X-linked chronic granulomatous disease gene codes for the beta-chain of cytochrome b-245. *Nature* 327: 720-721.
- Tonks, N. K., (2005) Redox redux: revisiting PTPs and the control of cell signaling. *Cell* 121: 667-670.
- Ueyama, T., T. Tatsuno, T. Kawasaki, S. Tsujibe, Y. Shirai, H. Sumimoto, T. L. Leto & N. Saito, (2007) A regulated adaptor function of p40phox: distinct p67phox membrane targeting by p40phox and by p47phox. *Mol Biol Cell* 18: 441-454.
- van Drogen, F., V. M. Stucke, G. Jorritsma & M. Peter, (2001) MAP kinase dynamics in response to pheromones in budding yeast. *Nat Cell Biol* 3: 1051-1059.
- Vignery, A., (2005) Macrophage fusion: the making of osteoclasts and giant cells. *J Exp Med* 202: 337-340.
- Vogel, H. J., (1956) A convenient growth medium for *Neurospora*. *Microbiol. Genet. Bull.* 13: 42-46.
- Vogt, N. & S. Seiler, (2008) The RHO1-specific GTPase-activating protein LRG1 regulates polar tip growth in parallel to Ndr kinase signaling in *Neurospora*. *Mol Biol Cell* 19: 4554-4569.

- Wedlich-Soldner, R., S. Altschuler, L. Wu & R. Li, (2003) Spontaneous cell polarization through actomyosin-based delivery of the Cdc42 GTPase. *Science* 299: 1231-1235.
- Wedlich-Soldner, R. & R. Li, (2003) Spontaneous cell polarization: undermining determinism. *Nat Cell Biol* 5: 267-270.
- Wedlich-Soldner, R., S. C. Wai, T. Schmidt & R. Li, (2004) Robust cell polarity is a dynamic state established by coupling transport and GTPase signaling. *J Cell Biol* 166: 889-900.
- Wendland, J., (2001) Comparison of morphogenetic networks of filamentous fungi and yeast. *Fungal Genet Biol* 34: 63-82.
- Wentworth, C. C., A. Alam, R. M. Jones, A. Nusrat & A. S. Neish, (2011) Enteric commensal bacteria induce extracellular signal-regulated kinase pathway signaling via formyl peptide receptor-dependent redox modulation of dual specific phosphatase 3. *J Biol Chem* 286: 38448-38455.
- Westergaard, M. M., H. K., (1947) Neurospora V. A synthetic medium favoring sexual reproduction. *Amer. J. Bot.* 34: 573-577.
- Wickner, W. & R. Schekman, (2008) Membrane fusion. *Nat Struct Mol Biol* 15: 658-664.
- Winterbourn, C. C. & M. B. Hampton, (2008) Thiol chemistry and specificity in redox signaling. *Free Radic Biol Med* 45: 549-561.
- Xiang, Q., C. Rasmussen & N. L. Glass, (2002) The *ham-2* locus, encoding a putative transmembrane protein, is required for hyphal fusion in *Neurospora crassa*. *Genetics* 160: 169-180.
- Yamaguchi, Y., K. Ota & T. Ito, (2007) A novel Cdc42-interacting domain of the yeast polarity establishment protein Bem1. Implications for modulation of mating pheromone signaling. *J Biol Chem* 282: 29-38.
- Yarden, O., M. Plamann, D. J. Ebbole & C. Yanofsky, (1992) *cot-1*, a gene required for hyphal elongation in *Neurospora crassa*, encodes a protein kinase. *EMBO J* 11: 2159-2166.
- Zekert, N., D. Veith & R. Fischer, (2010) Interaction of the *Aspergillus nidulans* microtubule-organizing center (MTOC) component ApsB with gamma-tubulin and evidence for a role of a subclass of peroxisomes in the formation of septal MTOCs. *Eukaryot Cell* 9: 795-805.
- Ziv, C., G. Kra-Oz, R. Gorovits, S. Marz, S. Seiler & O. Yarden, (2009) Cell elongation and branching are regulated by differential phosphorylation states of the nuclear Dbf2-related kinase COT1 in *Neurospora crassa*. *Mol Microbiol* 74: 974-989.

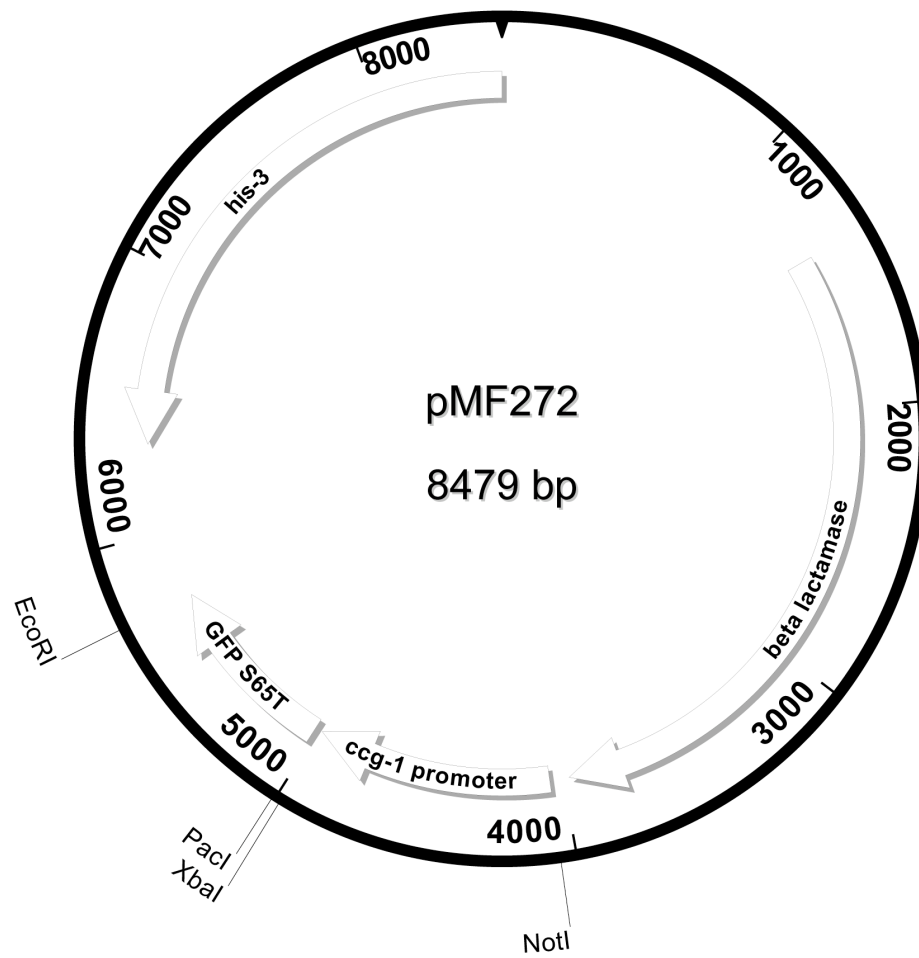


Abb. 5.1: Vektor pMF272



Die Angaben zu den Messwertfehlern in den folgenden Tabellen repräsentieren die Standardabweichung.

**Tab. 5.1: Makrokonidien pro Kulturröhrchen. n = 3**

Stamm	Sporen (*10 <sup>8</sup> ) pro Kulturröhrchen
N1-06 (WT)	3,27 ± 0,61
<i>Δbem-1-21-A1</i>	0,11 ± 0,11
<i>Δbem-1-2-A1</i>	0,47 ± 0,11
2208	3,20 ± 0,72

**Tab. 5.2: Lufthyphenwachstum. n = 3**

Stamm	mm/Tag
N1-06 (WT)	14,47 ± 0,40
<i>Δbem-1-21-A1</i>	5,10 ± 0,72
<i>Δbem-1-2-A1</i>	4,67 ± 0,35
2208	12,47 ± 1,08

**Tab. 5.3: Lineares Hyphenwachstum. n = 3**

Stamm	mm/Tag
N1-06 (WT)	74,33 ± 0,58
<i>Δbem-1-21-A1</i>	56,33 ± 2,52
<i>Δbem-1-2-A1</i>	50,67 ± 3,51
2208	87,67 ± 3,21

**Tab. 5.4: Mikrokonidien pro Kulturplatte. n = 3**

Stamm	Sporen (* 10 <sup>5</sup> ) pro Kulturplatte
N1-06 (WT)	5,74 ± 0,73
<i>Δbem-1-21-A1</i>	10,04 ± 6,05

**Tab. 5.5: Durchmesser vegetativer Hyphen. n = 50**

Stamm	μm
N1-06 (WT)	16,17 ± 3,36
<i>Δbem-1-21-A1</i>	15,55 ± 2,07

**Tab. 5.6: Abstand zwischen Verzweigungspunkten. n = 50**

Stamm	μm
N1-06 (WT)	110,24 ± 67,44
<i>Δbem-1-21-A1</i>	116,32 ± 60,70

**Tab. 5.7: Sporengröße (Makrokonidien). n = 3 x 50 Sporen**

Stamm	μm
N1-06 (WT)	6,08 ± 0,85
<i>Δbem-1-21-A1</i>	11,44 ± 2,48
<i>Δbem-1-2-A1</i>	10,47 ± 2,39
2208	5,79 ± 1,02
2210	8,25 ± 1,89

**Tab. 5.8: Keimschlauch-Durchmesser.** n = 50

Stamm	$\mu\text{m}$
N1-06 (WT)	$4,09 \pm 0,80$
$\Delta\text{bem-1-21-A1}$	$6,10 \pm 0,70$

**Tab. 5.9: Häufigkeitsverteilung der Anzahl der Kerne pro Spore.** Untersucht wurden je 157 Sporen (Makrokonidien) der  $\Delta\text{bem-1}$  Mutante (Stamm 2-HG) und des Wildtyps (Stamm WT-HG).

Anzahl Kerne pro Spore	Anzahl Sporen WT	Anzahl Sporen $\Delta\text{bem-1}$
1-3	98	17
4-6	47	34
7-9	12	45
10-12		39
13-15		6
16-18		7
19-21		3
22-24		2
25-27		1
28-30		2
31-33		1

**Tab. 5.10: Anzahl der Sporen mit mehr als einem Keimschlauch nach 2,5 Stunden bei 30°C.** n = 3 x 50 Keimlinge.

Stamm	%
N1-06 (WT)	$1,3 \pm 1,2$
$\Delta\text{bem-1-21-A1}$	$1,3 \pm 2,3$
2210	$53,5 \pm 2,6$

**Tab. 5.11: Gerichtete Keimlingsinteraktionen nach 2,5 Stunden bei 30°C.** n = 3 x 50 Keimlinge.

Stamm	%
N1-06 (WT)	$75,3 \pm 6,4$
$\Delta\text{bem-1-21-A1}$	$0,0 \pm 0,0$
2208	$73,7 \pm 8,5$
2210	$97,7 \pm 2,1$

**Tab. 5.12: Gerichtete Keimlingsinteraktionen nach 5 Stunden bei 30°C.** n = 3 x 50 Keimlinge.

Stamm	%
N1-06 (WT)	$100,0 \pm 0,0$
$\Delta\text{bem-1-21-A1}$	$21,7 \pm 10,4$

**Tab. 5.13: Häufigkeitsverteilung der gerichteten Keimlingsinteraktionen bezogen auf die überbrückte Distanz.** Untersucht wurden je 100 gerichtete Interaktionen der  $\Delta\text{bem-1}$  Mutante 21-A1 und des Wildtyps N1-06.

Distanz [ $\mu\text{m}$ ]	WT	21-A1
0,0 – 2,0	16	46
2,1 – 5,0	46	50
5,1 – 10,0	29	3
10,1 – 15,0	9	1

**Tab. 5.14: Prozentuales Verhältnis der Keimschlauchspitzen-Interaktionen zu den CAT-Interaktionen.** n = 3 x 30 Interaktionen

Stamm	Keimschlauchspitzen (%)	CATs (%)
N1-06 (WT)	53,3 ± 4,9	46,7 ± 4,9
$\Delta bem-1-21-A1$	0,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0

**Tab. 5.15: Gerichtete Keimlingsinteraktionen der Domänen Knock-out Mutanten nach 2,5 h bei 30°C.** n = 3 x 50 Keimlinge

Stamm	%
N1-06 (WT)	75,3 ± 6,4
$\Delta bem-1-21-A1$	0,0 ± 0,0
$\Delta PB1$	34,3 ± 12,4
$\Delta PX$	94,7 ± 4,6
$\Delta SH3a$	91,0 ± 9,5
$\Delta SH3b$	92,7 ± 3,1
$\Delta SH3ab$	5,3 ± 2,3

**Tab. 5.16: Makrokonidien pro Kulturröhrchen der Domänen Knock-out Mutanten.** n = 3

Stamm	Sporen (*10 <sup>8</sup> ) pro Kulturröhrchen
N1-06 (WT)	2,70 ± 0,53
$\Delta bem-1-21-A1$	0,29 ± 0,02
$\Delta PB1$	0,27 ± 0,08
$\Delta PX$	2,23 ± 0,40
$\Delta SH3a$	1,83 ± 0,50
$\Delta SH3b$	2,60 ± 0,35
$\Delta SH3ab$	0,30 ± 0,10

**Tab. 5.17: Sporengrößen der Domänen Knock-out Mutanten (Makrokonidien).** n = 50

Stamm	µm
N1-06 (WT)	6,08 ± 0,85
$\Delta bem-1-21-A1$	11,44 ± 2,48
$\Delta PB1$	10,47 ± 2,39
$\Delta PX$	6,57 ± 1,30
$\Delta SH3a$	7,30 ± 1,50
$\Delta SH3b$	8,30 ± 1,10
$\Delta SH3ab$	8,80 ± 1,10

**Tab. 5.18: Lineares Hyphenwachstum der Domänen Knock-out Mutanten.** n = 3

Stamm	mm/Tag
N1-06 (WT)	74,33 ± 0,58
$\Delta bem-1-21-A1$	56,33 ± 2,52
$\Delta PB1$	55,67 ± 2,89
$\Delta PX$	80,67 ± 1,53
$\Delta SH3a$	77,0 ± 2,0
$\Delta SH3b$	46,67 ± 0,58
$\Delta SH3ab$	46,67 ± 1,53

**Tab. 5.19: Prozentuales Verhältnis der Keimschlauchspitzen-Interaktionen zu den CAT-Interaktionen der Domänen Knock-out Mutanten.** n = 3 x 30 Interaktionen.

Stamm	Keimschlauchspitzen (%)	CATs (%)
N1-06 (WT)	52,9 ± 10,5	47,1 ± 10,5
<i>Δbem-1-21-A1</i>	5,6 ± 2,0	94,4 ± 2,0
<i>ΔPB1</i>	16,7 ± 8,8	83,3 ± 8,8
<i>ΔPX</i>	43,7 ± 4,5	56,3 ± 4,5
<i>ΔSH3a</i>	36,0 ± 8,7	64,0 ± 8,7
<i>ΔSH3b</i>	34,6 ± 9,1	65,4 ± 9,1
<i>ΔSH3ab</i>	25,7 ± 7,8	74,3 ± 7,8

**Tab. 5.20: FRAP-Analyse von CHS-1, SPA-2 und BEM-1 an der Hyphenspitze.**  
 Daten zu EG, 3.4.6;  $I_{t \text{ rel. corr.}}$  30 bzw. 60 s nach dem Bleichen; vgl. M&M, 2.6.4

<b>Datum</b>	<b>Datenbank</b>	<b>Name</b>	<b><math>I_{t \text{ rel. corr.}}</math> 30 s (%)</b>	<b><math>I_{t \text{ rel. corr.}}</math> 60 s (%)</b>
30.09.10	Timo3	Chs1_hypha1	51	98
30.09.10	Timo3	Chs1_hypha5	65	91
30.09.10	Timo3	Chs1_hypha6	73	76
mean			63	88
stdv			11	11
04.10.10	Timo4	Spa2_hypha5	52	100
04.10.10	Timo4	Spa2_hypha7	35	91
04.10.10	Timo4	Spa2_hypha8	71	101
mean			52,37	97,50
stdv			18,28	5,41
30.09.10	Timo3	BEM1_Hypha16	113,68	87,60
30.09.10	Timo3	BEM1_Hypha18	83,91	124,12
20.10.10	Timo	BEM-1 bleach6	87,45	78,59
mean			95,01	96,77
stdv			16,26	24,11

**Tab. 5.21: FRAP-Analyse von BEM-1 am Fusionspunkt. Daten zu EG, 3.4.4;**  
 $I_{t \text{ rel. corr.}}$  aus drei Experimenten zu untersch. Zeiten nach dem Bleichen (ZnBl.);  
 vgl. M&M, 2.6.4

<b>ZnBl. (s)</b>	<b><math>I_{t \text{ rel. corr.}}</math> bleach2</b>	<b><math>I_{t \text{ rel. corr.}}</math> bleach3</b>	<b><math>I_{t \text{ rel. corr.}}</math> bleach11</b>	<b>mean</b>	<b>stdv</b>
0	0	0	0	0	0,00
5	39	47	36	41	5,69
10	59	80	50	63	15,54
14	57	65	50	57	7,63
19	67	58	51	59	8,06
24	66	74	57	66	8,37
28	67	72	57	65	7,56
33	51	72	63	62	10,56
38	61	80	65	69	10,02
42	80	72	57	70	11,59

---

aa	<i>amino acid</i>
As	Aminosäure
bp	Basenpaare
<i>bem-1</i>	<i>bud emergence</i>
<i>ccg-1</i>	<i>clock control gene</i>
Cdk	<i>cyclin dependent kinase</i>
CRIB	<i>Cdc42 and Rac interaction binding</i>
DK	Diskussion
dpi	<i>days past inoculation</i>
EG	Ergebnisse
EL	Einleitung
FGSC	<i>fungus genetics stock center</i>
FRAP	<i>fluorescence recovery after photobleaching</i>
GEF	<i>guanine nucleotide exchange factor</i>
hpi	<i>hours past inoculation</i>
kb	Kilobasen
KO	knock out
LSM	<i>laser scanning microscopy</i>
M&M	Material und Methoden
MAPK	<i>mitogen activated protein kinase</i>
MAPKK	<i>mitogen activated protein kinase kinase</i>
MAPKKK	<i>mitogen activated protein kinase kinase kinase</i>
MM	Minimal-Medium
ORF	<i>open reading frame</i>
PAK	<i>p21 activated kinase</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
RT	Raumtemperatur
WT	Wildtyp

# DANKSAGUNG

---

Mein besonderer Dank gilt an erster Stelle meinem Mentor Prof. Dr. André Fleißner für die Gelegenheit, die er mir bot, an einem Forschungsthema zu arbeiten, das spannender nicht hätte sein können. Während der Zeit, in der ich unter seiner Leitung am Institut für Genetik der TU Braunschweig auf die Erstellung dieser Doktorarbeit hinarbeitete, unterstützte er mich sowohl bei der Planung der Experimente als auch bei der Interpretation der Ergebnisse mit stets größtem Einsatz und größter Hingabe.

Großem Dank bin ich Prof. Dr. Norbert Käufer verpflichtet für die freundliche Übernahme des Koreferats, sowie für die kritische Prüfung der von mir formulierten Interpretationen meiner Daten und die zahlreichen Anregungen, die ich im Laufe der Jahre von ihm erhalten habe.

Prof. Dr. Petra Dersch möchte ich herzlich für ihre Bereitschaft danken, den Vorsitz meiner Promotionskommission zu übernehmen.

Prof. Dr. Ralf Schnabel und Christian Hennig möchte ich für die Möglichkeit danken, hoch auflösende *live-cell*-Fluoreszenz-Mikroskopie betreiben zu können, sowie für die wertvolle wissenschaftliche und technische Unterstützung. Prof. Dr. Robert Hänsch möchte ich für die freundliche Bereitstellung des Laser-Scanning-Mikroskops sowie für seine fachliche Unterstützung danken. Dr. Meritzel Riquelme Pérez danke ich für die bereitwillige Überlassung des Vektors pESL-01-1.

Ebenso möchte ich allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Genetik für die breite Unterstützung und die angenehme Arbeitsatmosphäre danken. Jeder Einzelne hat zu meiner großen Freude beigetragen, die ich während meiner Arbeit hier am Institut empfand. Ganz besonders danke ich Ulrike Brandt für ihre großartige Unterstützung im Labor, Dr. Martin Lützelberger für wertvolle Diskussionen und seine große Hilfsbereitschaft. Martin Weichert, Julia Illgen, Ewald Priegnitz und Fabian Machens danke ich für das Korrekturlesen meiner Arbeit und für hilfreiche Anregungen. Marion Utecht und Ute Kyrath für so vieles. Meinen fleißigen Studenten Christian Adis, Jonas Andrich, Daniela Heine, Tina Karsten, Sophia Leschik, Ulrike Siegmund und Maria Victoria Aguilar Pontes möchte ich ebenfalls meinen Dank aussprechen.

---

Des weiteren gilt mein Dank Prof. Dr. Louise Glass für die Möglichkeit in den ersten zwei Monaten meiner Doktorarbeit in ihrem Labor erste Erfahrungen mit *Neurospora crassa* machen zu dürfen. Darüber hinaus möchte ich meinen Dank und meine Wertschätzung gegenüber folgenden Personen äußern, die mich wissenschaftlich und auch anderweitig inspiriert und bereichert haben: Prof. Dr. Paul Tudzynski, Dr. Sabine Giesbert, Prof. Dr. Mörschbacher, Dr. Steve Ruzin und Dr. Denise Schichnes (CNR Biological Imaging Facility, UC Berkeley), Spencer Diamond (UC Davis), Gitta Hamel und Dr. Hans van der Voort (SVI) sowie Dr. Gert van Cappellen und Dr. Adriaan Houtsmuller (OIC, Erasmus MC).

Allen Menschen, die mich an der Erstellung dieser Arbeit unterstützt haben und hier ungenannt bleiben, sei an dieser Stelle ebenfalls gedankt.

Herzlicher Dank gilt auch meinen Freunden, denen ich in Zukunft gerne wieder etwas mehr Zeit schenken möchte. Zu guter Letzt möchte ich mich bei meiner Familie bedanken, ganz besonders bei meinen Eltern, Geschwistern und Großeltern - für das, was sie sind und mir geben. Größter Dank gilt vor allem meiner lieben Frau Dr. Najlae Nejar und meinem lieben Sohn Jakob für ihre Zuneigung, ihr Verständnis und ihre Unterstützung.

*„Look deep into nature, and then you will understand everything better“*  
- Albert Einstein



# LEBENS LAUF

---

TIMO SCHÜRG

## PERSÖNLICHE DATEN

---

Name: Timo Schürg  
Akad. Grad: Dipl.-Biol.  
Geburtsdatum: 2. April 1980  
Geburtsort: Gifhorn

## AUSBILDUNG UND BERUFLICHER WERDEGANG

---

seit 10/2007	<b>Wissenschaftlicher Mitarbeiter</b> , Institut für Genetik Technische Universität Braunschweig  <b>Anstreben der Promotion</b> an der TU Braunschweig Forschungsthema: "Der molekulare Adapter BEM-1 in Zellpolarität, gerichtetem Wachstum und Zell-Fusion in <i>Neurospora crassa</i> " Mentor: Prof. Dr. André Fleißner  10/2007 - 12/2007 zweimonatiger Forschungsaufenthalt, Department of Plant and Microbial Biology (Prof. Dr. N. Louise Glass, UC Berkeley, CA)
04/2007 - 09/2007	<b>Wissenschaftliche Hilfskraft</b> , Institut für Molekularbiologie und Biotechnologie der Pilze (Prof. Dr. Paul Tudzynski), Westfälische Wilhelms-Universität Münster
10/2000 - 02/2007	<b>Studium der Biologie (Diplom)</b> Westfälische Wilhelms-Universität Münster Hauptfächer: Mikrobiologie, Botanik, Biochemie  04/2006 - 02/2007 <b>Diplomarbeit</b> zum Thema "Fungal Production, Sensing and Regulation of Reactive Oxygen Species (ROS) in the phytopathogenic Interaction of the Ascomycete <i>Claviceps purpurea</i> and its Host <i>Secale cereale</i> " am Institut für Molekularbiologie und Biotechnologie der Pilze, Westfälische Wilhelms-Universität Münster Mentoren: Prof. Dr. Paul Tudzynski, Dr. Sabine Giesbert  07/2004 - 09/2004 Praktikum, BASF Plant Science GmbH Ludwigshafen, Germany Abteilung <i>Enabling Technologies</i> (Dr. L. Loyall)  10/2002 - 07/2003 Studium der Biologie, Universität Alicante, Spanien

## SCHULE UND ZIVILDIENTST

---

09/1999 - 07/2000	<b>Zivildienst</b> im Heilpädagogischen Kindergarten der Lebenshilfe Gifhorn
06/1999	<b>Abitur</b> , Otto-Hahn-Gymnasium Gifhorn Hauptfächer: Biologie und Deutsch
06/1997 - 07/1997	Praktikum, Gesellschaft für Biotechnologische Forschung (GBF) mbH Braunschweig Abteilung Verfahrenstechnik der biologischen Entsorgung Leitung: Dr. R.-J. Müller

## STIPENDIEN UND AUSZEICHNUNGEN

---

03/2009	<b>Stipendium, Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG)</b> <ul style="list-style-type: none"><li>• Forschungsaufenthalt (zwei Wochen) während der Promotionszeit</li><li>• Department of Plant and Microbial Biology UC Berkeley, USA</li><li>• Mentoren: Prof. Dr. A. Fleißner, Prof. Dr. N.L. Glass</li></ul>
10/2007 - 12/2007	<b>Stipendium, Boehringer Ingelheim Fonds</b> <ul style="list-style-type: none"><li>• Forschungsaufenthalt (zwei Monate) während der Promotionszeit</li><li>• Department of Plant and Microbial Biology UC Berkeley, USA</li><li>• Mentoren: Prof. Dr. A. Fleißner, Prof. Dr. N.L. Glass</li></ul>
10/2002 - 07/2003	<b>ERASMUS-Programm, Universität Alicante, Spanien</b>

## ORGANISATIONEN UND KURSE

---

seit 10/2003	<b>Mitglied der biotechnologischen Studenteninitiative btS e.V.</b> <ul style="list-style-type: none"><li>• Organisation der Jobmesse <i>ScieCon</i> Berlin 2004</li><li>• Organisation von Podiumsdiskussionen zu wissenschaftlich/gesellschaftlich relevanten Fragen</li></ul>
10/2008	<b>Training "From Molecule to Organism"</b> <ul style="list-style-type: none"><li>• <i>cutting edge live-cell imaging</i>-Techniken</li><li>• Molecular Medicine Postgraduate School Erasmus MC, Rotterdam, Netherlands</li></ul>
10/2003 - 10/2004	<b>Leiter der Abteilung <i>Public Relations</i> der btS e.V</b> <ul style="list-style-type: none"><li>• Entwicklung eines neuen <i>Cooperative Design</i></li><li>• Initiierung einer neuen Geschäftsstelle in Bielefeld</li></ul>

## PUBLIKATIONEN

---

- Schürg T, Brandt U, Fleißner, A (manuscript in preparation). The *Saccharomyces cerevisiae* *BEM1* homolog in *Neurospora crassa* promotes coordinated behavior resulting in cell fusion.
- Dettmann A, Illgen J, Maerz S, Schürg T, Fleißner A, Seiler S (manuscript in preparation). HYM-1 functions as dual regulator of NDR and MAP kinase pathways to coordinate cell polarity with cell communication and sexual development in *Neurospora crassa*.
- Giesbert S, Schürg T, Scheele S, Tenberge KB, Tudzynski P (2008). The NADPH oxidase Cpnox1 is required for full pathogenicity of the ergot fungus *Claviceps purpurea*. *Mol Plant Pathol*, 9: 317-327.
- Gagern A, Schürg T, Michiels N, Schulte G, Sprenger D, Anthes N (2008). Behavioural response to interference competition in a sessile suspension feeder. *Marine Ecology Progress Series*, 353: 131-135.

## VORTRÄGE UND POSTER-PRÄSENTATIONEN AUF INTERNATIONALEN TAGUNGEN

---

- 2011 Illgen J, Schürg T, and Fleißner A: Subcellular localization influences the activity and function of the MAP kinase MAK-2 in cell signaling in *Neurospora crassa*. 10<sup>th</sup> VAAM Symposium on Molecular Biology of Fungi, Marburg, GER (Poster)
- 2010 The hyphal tip protein BEM-1 and its role in chemotropism, polarity and beyond. *Neurospora* satellite meeting of the 10<sup>th</sup> European Conference on Fungal Genetics, Leiden, Netherlands (**Vortrag**)
- Schürg T, Brandt U, and Fleißner A: Directed growth during germling fusion in *Neurospora crassa* requires BEM-1, a protein which is dispensable for general polar growth. 10<sup>th</sup> European Conference on Fungal Genetics, Leeuwenhorst, NL (Poster)
- 2009 BEM-1 is required for directed but not for general polar growth in *N. crassa*. 25<sup>th</sup> Fungal Genetics Conference at Asilomar, CA, USA (**Vortrag**)
- Schürg T, and Fleißner, A: BEM-1 is required for directed but not for general polar growth in *Neurospora crassa*. 25<sup>th</sup> Fungal Genetics Conference at Asilomar, CA, USA (Poster)
- Schürg T, and Fleißner, A: BEM-1 is required for directed but not for general polar growth in *Neurospora crassa*. 9<sup>th</sup> VAAM Symposium on Molecular Biology of Fungi, Münster, GER (Poster)
- 2008 Schürg T, and Fleißner, A: The role of BEM-1 during germling fusion in *Neurospora crassa*. 9<sup>th</sup> European Conference on Fungal Genetics, Edinburgh, GB (Poster)